

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-245470

(P2000-245470A)

(43)公開日 平成12年9月12日(2000.9.12)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	FI	テマコード(参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA 2B030
A01H 1/00		A01H 1/00	A 4B024
C07K 14/765		C07K 14/765	4B064
C12N 5/10		C12P 21/02	C 4B065
C12P 21/02		C12N 5/00	C 4H045

審査請求 未請求 請求項の数20 OL (全 33 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11-51904

(22)出願日 平成11年2月26日(1999.2.26)

(71)出願人 000173935

財団法人野田産業科学研究所

千葉県野田市野田399番地

(72)発明者 佐藤 忍

茨城県つくば市天王台1-1-1

(72)発明者 増田 進

千葉県野田市野田399番地 財団法人 野田産業科学研究所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 植物細胞間液による外来ポリペプチドの製造方法

(57)【要約】

【解決手段】 植物の細胞間液に外来ポリペプチドを分泌生産させ、該ポリペプチドを取得することを特徴とする外来ポリペプチドの生産方法、及び該方法に用いる、外来ポリペプチドの分泌機能を発現可能とするプロモーターDNA、

【効果】 本発明の方法により、植物導管液中に外来ペプチドを効率よく生産することができる。従って、本発明は産業上極めて有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物の細胞間液に外来ポリペプチドを分泌生産させ、該ポリペプチドを取得することを特徴とする外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 2】 植物の細胞間液が維管束液であることを特徴とする請求項 1 記載の外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 3】 維管束液が導管液であることを特徴とする請求項 2 記載の外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 4】 植物が植物細胞又は植物体であることを特徴とする請求項 1～3 記載の外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 5】 植物細胞又は植物体が単子葉植物又は双子葉植物の植物細胞又は植物体であることを特徴とする請求項 4 記載の外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 6】 植物細胞又は植物体が、マメ科植物、ナス科植物、アブラナ科植物、ウリ科植物、セリ科植物及びキク科植物のいずれかから選ばれた植物の植物細胞又は植物体であることを特徴とする請求項 4 記載の外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 7】 外来ポリペプチドがヒト血清アルブミンであることを特徴とする請求項 1 乃至 6 のいずれかの項記載の外来ポリペプチドの製造方法。

【請求項 8】 植物の細胞間液中に外来ポリペプチドを分泌させることができるシグナルペプチド及び外来ポリペプチドを発現可能とするプロモーター DNA。

【請求項 9】 プロモーター DNA が以下の (a) 又は (b) の塩基配列からなる請求項 8 記載のプロモーター DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列を含むプロモーター I DNA

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列において、1 もしくは複数の塩基が付加、欠失もしくは置換された塩基配列からなり、かつ細胞間液に外来ポリペプチドを分泌する機能を発現可能とするプロモーター I DNA

【請求項 10】 プロモーター DNA が以下の (a) 又は (b) の塩基配列からなる請求項 8 記載のプロモーター DNA。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列を含むプロモーター II DNA

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において、1 もしくは複数の塩基が付加、欠失もしくは置換された塩基配列からなり、かつ細胞間液 (アポプラスト液) に外来ポリペプチドを分泌する機能を発現可能とするプロモーター II DNA

【請求項 11】 請求項 8～10 のいずれかの項記載のプロモーター DNA 及び外来ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含む組み換え体 DNA。

【請求項 12】 請求項 8～10 のいずれかの項記載のプロモーター DNA、外来ポリペプチドをコードする構造

遺伝子及びシグナルペプチドをコードする遺伝子を含む組み換え体 DNA。

【請求項 13】 シグナルペプチドをコードする遺伝子が、以下の (a) 又は (b) のペプチドをコードするシグナルペプチド遺伝子。

(a) 配列番号 3 のアミノ酸配列からなるペプチド

(b) 配列番号 3 のアミノ酸配列において、1 もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつシグナルペプチド活性を有するペプチド

【請求項 14】 請求項 8～10 のいずれかの項記載のプロモーター DNA、外来ポリペプチドをコードする構造遺伝子及びターミネーターを含む組み換え体 DNA。

【請求項 15】 請求項 8～10 のいずれかの項記載のプロモーター DNA、外来ポリペプチドをコードする構造遺伝子、シグナルペプチドをコードする遺伝子及びターミネーターを含む組み換え体 DNA。

【請求項 16】 請求項 8 乃至 10 のいずれかの項記載のプロモーター DNA を含む発現ベクター。

【請求項 17】 請求項 11 乃至 15 のいずれかの項記載の組換え体 DNA を含む発現ベクター。

【請求項 18】 請求項 16 又は 17 記載の発現ベクターにより形質転換された植物細胞。

【請求項 19】 請求項 18 記載の植物細胞より再生された植物体。

【請求項 20】 請求項 19 記載の植物体を栽培して外来ポリペプチドを製造することを特徴とする、外来ポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、植物に係わる遺伝子組換え技術を用いて植物細胞あるいは植物体に外来ポリペプチドを分泌生産させる方法、それら方法に用いるプロモーター等に関する。

【0002】

【従来の技術】 組換え DNA 技術は適当な遺伝子組換え形質転換体を用いることにより、通常では生産しえないような外来ポリペプチドの生産を可能にしてきた。植物を宿主として用いた生産系もそのひとつである。しかし、現在のところ、外来ポリペプチド生産のための宿主として植物が用いられている実用例は少ない。従来、植物において、遺伝子工学的技術を用いて外来ポリペプチドの生産を行なう場合、ある種のプロモーターの下流に、該植物内で発現させたいポリペプチドの構造遺伝子 (以下、目的とする構造遺伝子と記す。) を連結させたキメラ遺伝子を植物細胞に導入し、得られた植物細胞を通常の植物細胞培養技術により再生させ、目的とする外来ポリペプチドを発現する形質転換植物体を作製する方法が知られている。上記の方法で用いられる代表的なプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス

ス35Sプロモーター（以下、35Sプロモーターと記す。）があり、該プロモーターは、植物細胞内で目的とするポリペプチドを組織非特異的に発現させることが知られ、比較的汎用性の高いプロモーターとして、特に試験研究において広く使用されている。しかしながら、組織非特異的な発現では、植物のあらゆる組織から、目的のポリペプチドを精製する必要がある、低コストで、かつ効率的に多量に生産することは困難であった。すなわち、植物体である各種器官、例えば、果実部、根茎部、葉部、茎部等で外来ポリペプチドを生産させた場合、目的以外の種々の不純なポリペプチドを多量に含み、通常の微生物の発酵によるコストに較べて、精製コストが大幅にかかる点が欠点であった。高等植物は長い進化の過程で多細胞化し、組織さらには器官を分化させ環境への適応をはかってきた。それらの組織や器官を構成する細胞は細胞壁に取り囲まれており、その細胞壁の間は細胞間液（アポプラスト液）で満たされている。特に、植物の大型化にともなって、水分や栄養分の各組織間への輸送が非常に重要となり、植物に含まれる細胞間液が大きな役割を果たしている。特に、高等植物、なかんずくシダ植物、裸子植物、被子植物等の植物に認められる木部（導管および仮導管）と師部（師管）からなる維管束は輸送機能を持つ代表的な器官である。維管束液の一つである導管液には土中から吸収した水分や無機栄養素に加え、根で合成された植物ホルモン、糖質等様々な物質が含まれている。例えば、カボチャの導管液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけると、いくつかのポリペプチドのバンドが認められるのみで、導管液中にポリペプチドが比較的純粋な状態で存在することが明らかにされている（S. Satoh et al. Plant Cell Physiol., 33, 841, 1992）。このような植物の細胞間液（アポプラスト液）に組織特異的に外来ポリペプチドを分泌生産させることができれば、他の微生物や動物培養細胞のタンク発酵培養による外来ポリペプチドの生産コストに比較して、コスト的に有利な製造方法が期待される。関連の技術として、最近、特定器官として根に特異的な発現を可能にするプロモータを用いた、根部における維管束において目的とするタンパク質の発現を目指した方法（特開平10-52273号公報）がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、植物細胞間液（アポプラスト液）中に外来ポリペプチドを効率よく分泌生産させること、すなわち、植物特有の組織特異的な生体機能を利用することにより、複雑な精製工程を経ることなく容易に外来ポリペプチドを取得する方法及びそれら方法に用いるプロモーター、シグナルペプチド等を提供することにある。

【0004】

【課題を解決しようとする手段】本発明者らは、上記問題を解決すべく鋭意検討を行った結果、植物の細胞間

液（アポプラスト液）の一つである導管液中に、特異的にポリペプチドを分泌する機能を利用することにより外来ポリペプチドを生産せしめる方法を見出した。そして、細胞間液（アポプラスト液）分泌機能因子の一つとして、導管分泌プロモーターを及びシグナル配列を見出した。そこで、遺伝子工学の手法に基づき、植物細胞内に、得られた導管分泌プロモーター遺伝子、目的の外来ポリペプチドをコードする遺伝子および植物分泌シグナル配列領域遺伝子等を、遺伝子レベルで構築することにより、外来ポリペプチドを効率よく植物細胞間液（アポプラスト液）中に分泌生産する方法を確立し、本発明を完成するに至った。

【0005】すなわち、本発明は、植物の細胞間液に外来ポリペプチドを分泌生産させ、該ポリペプチドを取得することを特徴とする外来ポリペプチドの製造方法にある。上記植物の細胞間液としては維管束液が挙げられ、またその維管束液としては導管液が挙げられる。上記植物は植物細胞又は植物体を含むものであり、それらは単子葉植物又は双子葉植物の植物細胞又は植物体を含むものである。そして、それらの具体例としてはマメ科植物、ナス科植物、アブラナ科植物、ウリ科植物、セリ科植物及びキク科植物が挙げられる。

【0006】また、上記外来ポリペプチドとしてはいずれのものでも良いが、例えばヒト血清アルブミンが挙げられる。さらに、本発明は、植物の細胞間液中に外来ポリペプチドを分泌させることができるシグナルペプチド及び外来ポリペプチドを発現可能とするプロモーターDNA並びにシグナルペプチドにある。

【0007】上記プロモーターDNAは以下の（a）又は（b）の塩基配列からなるものである。

（a）配列番号1に記載の塩基配列を含むプロモーターI DNA

（b）配列番号1に記載の塩基配列において、1もしくは複数の塩基が付加、欠失もしくは置換された塩基配列からなり、かつ細胞間液に外来ポリペプチドを分泌する機能を発現可能とするプロモーターI DNA

さらに、上記プロモーターDNAとしては、以下の（a）又は（b）の塩基配列からなるものである。

【0008】（a）配列番号2に記載の塩基配列を含むプロモーターII DNA

（b）配列番号2に記載の塩基配列において、1もしくは複数の塩基が付加、欠失もしくは置換された塩基配列からなり、かつ細胞間液（アポプラスト液）に外来ポリペプチドを分泌する機能を発現可能とするプロモーターII DNA

さらに、本発明は、上記プロモーターDNA及び外来ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含む組み換え体DNAにある。さらに、本発明は、上記プロモーターDNA、外来ポリペプチドをコードする構造遺伝子及びシグナルペプチドをコードする遺伝子を含む組み換え体DNAにあ

る。

【0009】前記シグナルペプチドをコードする遺伝子としては、以下の (a) 又は (b) のペプチドをコードするシグナルペプチド遺伝子である。

(a) 配列番号3のアミノ酸配列からなるペプチド

(b) 配列番号3のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されたアミノ酸配列からなり、かつシグナルペプチド活性を有するペプチド

さらに、本発明は、上記組み換え体DNA及びターミネーターを含む組み換え体DNAにある。そして、このターミネーターは任意のものでよい。

【0010】さらに、本発明は、上記プロモーターDNAを含む発現ベクター、あるいは、上記いずれかの組み換え体DNAを含む発現ベクターにある。さらに、本発明は、上記発現ベクターにより形質転換された植物細胞、あるいは、該植物細胞より再生された植物体にある。さらに、本発明は、上記植物体を栽培して外来ポリペプチドを生産することを特徴とする、外来ポリペプチドの製造方法にある。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を具体的に説明する。本発明で用いられる遺伝子工学的技術は、例えば、J. Sambrook, E. F., Fritsch, T., Maniatis 著、モレキュラークローニング第2版 (Molecular Cloning 2nd edition, 1989) 及び D. H. Cleeve 著、DNAクローニング (DNA Cloning, 1985) 等に記載されている通常の方法が用いられる。本発明の植物の細胞間液としては維管束液やブドウ、ミズキ、サトウカエデ、ヤシ類の出水水等が挙げられ、維管束液の例としては導管液、仮導管液、篩管液等が挙げられる。上記細胞間液由来の植物及び本発明により外来ポリペプチドを分泌生産させるための宿主としての植物は、細胞間液を有する植物であればシダ植物、被子植物、裸子植物等如何なる植物でもよい。更に、単子葉植物又は双子葉植物の何れでもよく、それらの例としてはイネ科植物、マメ科植物、ナス科植物、アブラナ科植物、ウリ科植物、セリ科植物及びキク科植物が挙げられる。更に具体的にはイネ、トウモロコシ、オオムギ、コムギ等の単子葉植物、ダイズ、エンドウ、トマト、ジャガイモ、ナス、キュウリ、カボチャ、ウリ、ニンジン、セロリ等の双子葉植物が挙げられる。

【0012】本発明で分泌生産される外来ポリペプチドとしては、宿主植物が生産することのできないポリペプチドで他の植物や微生物、動物由来の産業上有用なポリペプチドを適宜、選択することができる。具体例としてはヒト血清アルブミン、グリーン蛍光タンパク質 (以下、GFP と略す) 等が挙げられるが、その他、インシュリン、ヒト成長ホルモン等のペプチドホルモン、インターフェロン等の生体内活性因子製剤、ウロキナーゼ、パーオキシダーゼ等の酵素、インフルエンザワクチン等の

ワクチン、フィブリン等の繊維蛋白質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これら外来ポリペプチドの構造遺伝子は既にその構造が明らかになっており、比較的容易に入手することができる。本発明の植物の細胞間液において外来ポリペプチドの分泌機能を発現可能とするプロモーターDNA (以下、本発明プロモーターDNAと言う。) 及び本発明のシグナルペプチドをコードする遺伝子は、次のようにして調製することができる。

10 【0013】まず、本発明に用いる植物の細胞間液のアセトン沈殿区分をSDS-PAGE法により解析し、細胞間液に含まれる精製主要ポリペプチドバンドを分取し、プロテインシーケンサー477A (ABI社製) 等により、そのN末端アミノ酸配列を決定する。一方、同じ植物体より、常法にしたがって得られたmRNAを鋳型としてcDNAを得る。先に得られたN末端アミノ酸配列をもとに設計された合成ミックスプライマーを用いて、得られたcDNAを鋳型としてPCRを行い増幅産物を得る。この増幅産物をプラスミドベクターにクローニングする。DNA配列に基づき、種々のプライマーDNAを作成して、RT-PCR法、5'-RACE法

20 や3'-RACE法等の適当なPCR法により、主要ポリペプチドDNAの断片を含むDNAを特異的に増幅させて、これらを連結させて該DNAの全長を含むcDNAクローンを単離することができる。

【0014】この他、細胞間液に含まれるポリペプチドをコードするcDNAクローンを単離する方法として、導管中に含まれる全ポリペプチドに対する抗血清を用いて、根由来のcDNAの発現ライブラリーをスクリー

30 ングする方法もある。このようにして得られたcDNA配列から予想されるアミノ酸配列と実験的に決定したN末端アミノ酸配列と比較して、シグナル配列領域を特定することもできる。

【0015】プロモーター領域を取得する方法としては、次のような方法が挙げられる。例えば、同じ植物の葉部よりゲノムDNAを調製し、適当な酵素で部分分解後、ファージ由来のベクターアームに連結し、これを *in vitro* パッケージングしてファージ粒子を作らせ、さらに大腸菌に感染させて寒天培地上にプラークを形成させ、回収して、ゲノミックライブラリーとして本発明プロモーター領域を含むと予想されるゲノミッククロー

40 のスクリーニングに用いることができる。

【0016】また、既知のcDNA領域の配列をもとに特異的なプライマーを合成し、非特異的 (任意) プライマーと組み合わせてPCR反応を行い、未知ゲノムDNA領域を特異的に増幅する方法 (TAIL-PCR法) により、cDNAに隣接するプロモーター領域を含む配列を得ることもできる。このようにして、本発明プロモーター部分を含むと予想されるゲノミッククローンを単離すること

【0017】得られたcDNA及びプロモーター部分を
含むと予想されるDNA断片は、DNA調製や解析が容
易なプラスミドベクター、例えば、pUC18、pUC
19、pBLUESCRIPTKS+、pBLUESC
RIPTXS-（いずれも宝酒造社製）等にサブクロ
ーニングして、プラスミドDNAを調製し、Sanger等のP
CR法（J.Mol.Biol., 94, 441(1975), Proc.Natl.Acad.S
ci., 74, 5463 (1977)）、Saiki等のPCR法（Science,
230, 1350(1985)）を組み合わせたサイクルシーケンス
法を用いて塩基配列を決定することができる。

【0018】この本発明プロモーターDNAの具体例と
しては、配列番号1（プロモーターI）及び配列番号2
（プロモーターII）に示すものが挙げられるが、また、
これらのプロモーターI及びIIのDNAは、それが外来
ポリペプチドの分泌機能を発現可能とする機能を有する
かぎりそれら配列番号1及び2において1もしくは複数の
塩基が付加、欠失もしくは置換された変異体であって
も良い。さらに、本発明プロモーターI及びIIのDNA
には、それぞれ配列番号1及び2記載の塩基配列の3'
末端に翻訳効率を上げる塩基配列などを付加したもの
や、上記機能を有するかぎり、5'末端を欠失したもの
も含まれる。

【0019】また、本発明のシグナルペプチドをコード
する遺伝子の具体例としては、そのアミノ酸配列が配列
番号3で示されるペプチドをコードする遺伝子が挙げら
れるが、また、このペプチドのアミノ酸配列はそれがシ
グナルペプチドをコードするものである限り配列番号3
において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしく
は置換された変異体であっても良い。

【0020】本発明プロモーターDNA及び外来ポリペ
プチドをコードする構造遺伝子を含む組み換え体DNA
A、及びこの組み換え体DNAにシグナルペプチドをコ
ードする遺伝子を組み込んだ組み換え体DNAは、通
常、本発明プロモーターと構造遺伝子の間にシグナル
ペプチドをコードする遺伝子を連結し、目的とする組み
換え体DNAを得ることができる。

【0021】又、本発明の上記各種組み換え体DNAの
下流領域に、ターミネーターを組み込むことにより、外
来ポリペプチドの発現効率をさらに高めた組み換え体D
NAを得ることができる。ターミネーターとは植物細胞
内で目的の構造遺伝子を効率的に転写終結させる能力を
有するようなターミネーターを意味し、一般には、各種
のポリペプチドの構造遺伝子の下流に存在している。本
発明のターミネーターとしては、特に限定はなく、何れ
のターミネーターも使用でき、例えば、植物遺伝子由来
のノバリンシンターゼ遺伝子のターミネーター、ニンニ
クウイルスGV1、GV2遺伝子のターミネーター等が
挙げられる。

【0022】これらの組み換え体DNAは、通常一般の
遺伝子工学的手法により比較的容易に調製することがで

きる。すなわち、上記本発明プロモーターDNA、外来
ポリペプチドの構造遺伝子、シグナルペプチドをコード
する遺伝子、ターミネーターはそれぞれの機能を有する
範囲内で、BamHI、SacI、XhoI、XbaI、EcoRV、EcoRI、Sma
I、HindIII等の制限酵素を用いて適宜切除、連結し、目
的とする組み換え体DNAを調製することができる。

【0023】本発明の発現ベクターは、上記調製された
組み換え体DNAと、宿主染色体とは物理的に独立して
自律複製し、安定に遺伝することができるベクターを含
んでなり、通常一般の遺伝子工学的手法により比較的簡
単に調製することができる。本発明に用いられるベク
ターとしては、例えば、pBI101（CLONTECH社製）、pBIN
19（Nuc.Acid.Res.12, 8711-8721 (1984)）、アグロバク
テリウムのTiプラスミドやRiプラスミド等が挙げられ
る。また、植物ウイルス、例えば、カリフラワーモザ
イクウイルスをベクターとして利用することもできる。

【0024】本発明の形質転換植物細胞は、上記発現ベ
クターを用いて調製することができる。本発明にかかる
形質転換方法としては、電気的導入方法（プロトプラス
トへの電気的導入方法：エレクトロポレーション
法）、パーティクルガンによる直接導入方法、あるいは、
アグロバクテリウム菌を植物組織に感染させる方法
等の公知の方法が挙げられる。これらの方法の選択は本
発明における発現ベクターが植物に導入されその植物に
遺伝的に安定して取り込まれる限り、本発明にとって本
質的でない。以下、アグロバクテリウムのTiプラスミ
ドをベクターとして用いる方法について説明する。

【0025】アグロバクテリウム属に属する細菌が植物
に感染すると、それが持っているプラスミドDNAの一
部を植物ゲノム中に移行させるという性質を利用して、
目的の遺伝子を植物体に導入することができる。アグロ
バクテリウム・ツメファシエンズ（*Agrobacterium tume
faciens*）は植物に感染してクラウンゴールと呼ばれる
腫瘍を引き起こす。これは、感染の際に細菌中に存在す
るTiプラスミド上のT-DNA領域（Transferred D
NA）と呼ばれる領域が植物中に移行し、植物のゲノム
中に組み込まれることによる。さらに、Tiプラスミド
上にはT-DNA領域が植物中に移行し、植物のゲノム
中に組み込まれるために、Vir領域が必須である。こ
のようにして、T-DNA領域とそこに挿入した本発明
の組み換え体DNA、およびVir領域を含むTiプラ
スミドを持つアグロバクテリウム・ツメファシエンズを
宿主植物の種子、葉片やプロトプラストに感染させて本
発明の形質転換植物細胞を得る。

【0026】本発明の形質転換植物は、得られた形質転
換植物細胞から、例えば、内宮博文著、植物遺伝子操作
マニュアル（トランスジェニック植物の作り方）講談社
サイエンティフィック、27-55頁、（1990）、
S.B.Gelvin, R.A.Schilperoot and D.P.S.Verman 著、ブ
ラント・モレキュラー・バイオロジー／マニュアル（PI

ant Molecular Biology/Manual, Kluwer Academic Publishers press, 1988)、Valvekens et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 85:5536-5540 (1988)等に記載の通常の植物細胞培養方法により得ることができる。

【0027】以下に、キュウリにおける、アグロバクテリウムによる目的発現ベクターの導入及び形質転換細胞の植物体への再生について具体的に説明する。キュウリの種子を常法にしたがって、MSプレートに播種し、無菌的に栽培する。子葉の切片を用いて再分化プレート上でカルス培養を行なう。本発明の組み換え体DNAを挿入したカナマイシン及びハイグロマイシン耐性遺伝子を有するTiプラスミド(本発明の発現ベクター)により形質転換したアグロバクテリウムを培養し、希釈したものをチューブに分注し、子葉の切片を浸し、数日間、再分化プレート上で共存培養する。アグロバクテリウムが肉眼で観察できるまで十分に増殖したら、除菌操作を行ない、再分化プレート上で数日間培養を行なう。これらの切片を最終的に再分化プレート上で培養し、一週間ごとに新しいプレートに移植を繰り返す。形質転換した切片は増殖を続け、カルスが現れてくる。抗生物質で選択しているため、非形質転換切片は褐変する。形質転換体が5mm程度の大きさになり、カルスを形成するまで培養する。完全なカルスの形状を示すようになったら、子葉部分を含まないようにメスで切り取り、再分化プレートに移植する。発根後、無機塩類培地に浸したロックウール上に定植し、本発明の植物体を得ることができる。

【0028】なお、発根した植物体を無機塩類培地に浸した土に移植し、種子を得ることができる。この種子を滅菌処理しMS培地に播種して発芽させた形質転換植物より、常法にしたがってDNAを抽出し、このDNAを適当な制限酵素で切断し、本発明プロモーターDNAをプローブに用いてサザンハイブリダイゼーションを行ない、形質転換の有無を確認することができる。

【0029】

【実施例】以下に実施例によりさらに本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はその技術的範囲が実施例に限定されるものではない。なお、この実施例で用いる培地のそれぞれの組成は次のとおりである。

【0030】(i) キュウリ用培地

a) MS培地

MURASHIGE AND SKOOG (Flow Laboratories) 4.4gを蒸留水1Lに溶かし、1M KOHでpH 5.8に調整し、ゲルライト(和光純薬)を2.5g添加した後、オートクレーブ滅菌した。

b) MS-BA培地

MS培地に、3gのショ糖、6-ベンジルアミノプリン(BA) 2.0 μg/ml、アブシジン酸(ABA) 1.0 μg/mlを添加した培地である。

c) MS-BAC培地

MS-BA培地にクラフオラン200 μg/mlを添加した培地で

ある。

d) MS-BACK 培地

MS-BAC培地にカナマイシン100 μg/mlを添加した培地である。

e) MS-CK培地

MS培地に、カナマイシン100 μg/ml、クラフオラン200 μg/mlを添加した培地である。

【0031】(ii) 細菌用培地

a) L-培地

10 バクトトリプトン(Difco) 10g、バクトイーストエキストラクト(Difco) 5g、NaCl 10gを蒸留水1Lに溶かし、5N NaOHでpH 7.0に調整し、オートクレーブ滅菌する。プレートの場合はこれに15gの寒天を添加する。

b) NZY培地

イーストエキストラクト5g、NZアミン10g、NaCl 5g、MgSO₄・7H₂O 2gを蒸留水1Lに溶かし、5N NaOHでpH 7.5に調整し、オートクレーブ滅菌する。プレートの場合はこれに15gの寒天(Difco)を添加しておく。

c) トップアガー

20 NZY培地100mlにAgarose-II(Dojin) 0.7gを添加したものである。

【0032】〔実施例1〕本発明プロモーターIの単離導管液中の主要タンパク質をコードする遺伝子を単離し、さらにそのプロモーター領域を取得した。以下にそのスクリーニング方法を説明する。

(1) キュウリ導管水の取得

播種後6週目のキュウリ(*Cucumis sativus* cv. Shimos hirazu-jibai)を、葉部を含まないように地上部15から30cmのところで切断し、導管液の最初の数滴を捨て、切断表面を滅菌水で洗浄した後、チューブを茎につなぎ、導管液を氷中のチューブに回収した。

【0033】(2) 導管液中に存在するタンパク質の検出

導管液をアセトン濃縮し、300 μl相当の導管液をSDS-PAGEで解析した。30 kDaほどの位置に主要なタンパク質バンドを確認し、このタンパク質をXSP30(xylem sap protein)と名付けた。このXSP30タンパク質をアクリルアミドゲルから切り出し、溶出バッファー(0.1 M酢酸ナトリウム、0.1% SDS、pH 8.5)中に溶出させた。プロテインシーケンサー377A(ABI)で、この溶出液に含まれるタンパク質(XSP30)をN末端アミノ酸配列で解析したところ、配列番号4に示す通りの配列であった。XSP30の全一次構造を明らかにするために、以下に示すPCR法によりXSP30をコードするcDNAをクローニングした。

【0034】(3) キュウリ根mRNA及びcDNAの調製

キュウリ根を液体窒素存在下で粉碎した後、SDS-フェノール法(農村文化社、植物バイオテクノロジー実験マニュアル(1989))に準じてmRNAを精製した。cDNAの合成は、この精製して得たmRNAを鋳型とし、RNA PCR kit (AMV) Ver. 2.1(宝酒造社製)を用いて行なった。この際の

プライマーとしてキットに付属のOligo dTアダプタープライマーを用いた。

【0035】(4) XSP30のcDNA断片の取得とcDNAのクローニング

プロテインシーケンサーで明らかになったXSP30のN末端アミノ酸配列をもとに設計したミックスプライマー(プライマー1(配列番号5)及びプライマー2(配列番号6))を合成した。前工程で得たcDNAを鋳型として、合成したミックスプライマー(プライマー1(配列番号5)とキットに付属のアダプタープライマーを用いて、PCR反応(94℃1分、45℃1分、72℃2分を1サイクルとして30サイクル)を行なった。さらに前PCR工程で得た増幅産物を100倍に希釈し、鋳型とし、合成したミックスプライマー(プライマー2(配列番号6)とキットに付属のアダプタープライマーを用いて、PCR反応(94℃1分、55℃1分、72℃2分を1サイクルとして30サイクル)を行なったところ、約800 bpの増幅産物を得た。増幅反応の際のポリメラーゼにはEx Taq DNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用い、付属の緩衝液とdNTP基質を説明書に従って用いた。サマルサイクラーにはパーキンエルマー社製のGENIE AMP PCR SYSTEM 9600を用いた。この産物をライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて、プラスミドベクターpT7Blue(ノバゲン社製)と連結し、反応液を大腸菌JM109コンピテントセル(東洋紡社製)に加え、トランスフォーメーションを行い、アンピシリン100 µg/mlを含むLBプレートにまいた。37℃で一晩培養後、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製した。挿入DNAの塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いてDNAシーケンサー(Model 373S, アプライドバイオシステムズ社製)により調べた。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列は、明らかになっているXSP30のN末端アミノ酸配列の16残基目から23残基目までに相当し、目的の遺伝子の断片が増幅されていることがわかった。

プライマー1: gtnccnggnaaytayggntaygg (配列番号5)

プライマー2: tayggngtngntayggngngtnc (配列番号6)

【0036】次に、前工程で明らかになった領域を含めて更に3'下流の塩基配列を、以下のように3' RACE法で得た。この際3' -Full RACE Core Set(宝酒造社製)のキットを用いた。まずこの為のPCRの上流側プライマーとして、前工程で明らかになった塩基配列のなかから次の配列を選んで合成し、これをプライマー3(配列番号7)とした。キュウリ根より抽出したmRNAを鋳型とし、キットに付属のOligodT-3sites Adapter primerを用いて逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成した。得られた一本鎖cDNAを鋳型とし、プライマー3とキットに付属の3sites Adapter Primerを用いてPCR反応を行なったところ、

約700 bpの増幅産物を得た。この産物をライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて、プラスミドベクターpT7Blue(ノバゲン社製)と連結し、反応液を大腸菌JM109コンピテントセル(東洋紡社製)に加え、トランスフォーメーションを行い、アンピシリン100 µg/mlを含むLBプレートにまいた。37℃で一晩培養後、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製した。挿入DNAの塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit(アプライドバイオシステムズ社製)を用いてDNAシーケンサー(Model 373S, アプライドバイオシステムズ社製)により調べた。XSP30 cDNAの3'端の塩基配列を領域が増幅されていることがわかった。

プライマー3: cagaagaatgacggaaccata (配列番号7)

【0037】前工程までに得られた配列よりXSP30 cDNAの5'端の塩基配列を以下のようにして、5' RACE法により調べた。この際5' -Full RACE Core Set(宝酒造社製)のキットを用いた。前工程の解析で明らかになった配列をもとにプライマー4(配列番号8)、プライマー5(配列番号9)、プライマー6(配列番号10)、プライマー7(配列番号11)、プライマー8(配列番号12)を合成した。キュウリ根より抽出したmRNAを鋳型とし、プライマー4(配列番号8)を用いて逆転写酵素により一本鎖cDNAを合成した。得られた一本鎖cDNAを鋳型とし、2段階のPCR反応を行なった。プライマー5(配列番号9)とプライマー6(配列番号10)とを組み合わせPCR反応を行なった後、プライマー7(配列番号11)とプライマー8(配列番号12)とを組み合わせPCR反応を行なったところ、約700bpの増幅産物を得た。ライゲーションキットを用いて、この産物をプラスミドベクターpT7Blueと連結し、反応液を大腸菌JM109コンピテントセルに加え、トランスフォーメーションを行い、アンピシリン100 µg/mlを含むLBプレートにまいた。37℃で一晩培養後、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製した。挿入DNAの塩基配列は、Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kitを用いてDNAシーケンサーにより調べたところ、XSP30 cDNAの5'端を含む領域の塩基配列を得た。

【0038】以上のRT-PCR、3' RACE、及び5' RACEの結果からXSP30 cDNAの全長の塩基配列(配列番号13)が明らかになり、予想される開始メチオニンが1ヶ所であることから、XSP30の全長アミノ酸配列(配列番号14)を予想することができた。また、成熟XSP30のN末端配列が配列番号4であることから、XSP30には21アミノ酸からなるシグナル配列(配列番号3参照)が含まれていることが明らかとなった。

プライマー4: 5'-agaagtcaagcaatagttttt-3' (配列番号8)

プライマー5: 5'-aaaaacttcagcagccaa-3' (配列番号9)

プライマー6: 5'-ggggtcataataaagca-3' (配列番号10)

0)

プライマー7: 5'-agcaaaatttatcattca-3' (配列番号11)

プライマー8: 5'-gtagtaagtgtgtgt-3' (配列番号12)

【0039】次に、前工程で明らかになったXSP30のゲノム上流側の配列を得るために、得られたXSP30cDNA塩基配列をもとにプライマーを設計し、The Plant Journal Vol.8, 457-463(1995)記載の方法により、TAIL-PCRを行い、XSP30の上流プロモーター領域のクローニングを行った。PCRの工程を以下に示す。まず、得られたXSP30 cDNAの配列をもとにプライマー9 (配列番号15)、プライマー10 (配列番号16)、プライマー11 (配列番号17)、プライマー12 (配列番号18)を合成した。プライマー12 (配列番号18)とプライマー9 (配列番号15)とを組み合わせ、キュウリゲノムDNAを鋳型としてPCR反応 (93℃、1min、95℃、1min)を1サイクル、(94℃、1min、60℃、1min、72℃、2.5min)を5サイクル、(94℃、1min、25℃、3min、72℃まで3minで徐々に加温、72℃、2.5min)を1サイクル、(94℃、1min、68℃、1min、72℃、2.5min、94℃、30sec * 10

プライマー9: 5'-tcttctgggtccatttctgttagg-3' (配列番号15)

プライマー10: 5'-ctttccgtgacttcccaactttgtg-3' (配列番号16)

プライマー11: 5'-cgtcacatggtgataatogagttgg-3' (配列番号17)

プライマー12: 5'-ngtcgaswganawgaa-3' (配列番号18)

【0040】【実施例2】本発明プロモーターIIの単離キュウリ根より調製したmRNAを用いて、cDNAライブラリーを作製した。ラットに免疫して得た抗導管液血清を用いて、cDNAライブラリーをスクリーニングし、いくつかのポジティブクローンを取得した。以下にそのスクリーニング方法について説明する。

【0041】(1)本発明タンパク質遺伝子の単離播種後6週目のキュウリ根10gからmRNAを取得し、オリゴdTプライマーを用いて、二本鎖cDNAを合成したライブラリーを作製した (cDNA作製キット、ファルマシア)。λgt11 (プロメガ) のEcoRIサイトに合成したcDNAを挿入し、cDNAライブラリーの作製した。

【0042】一方、キュウリの茎から採取した導管液を凍結乾燥後、ラットに免疫して抗導管液血清を調整した。この抗導管液ポリクローナル抗体を用いて、キュウリ根cDNA発現ライブラリーに対してスクリーニングを行った結果、ポジティブクローンを得た。このプラスミドをλXSP4と名付けた。このλXSP4 DNAを制限酵素EcoRIで消化し、約600 bpのDNA断片をpUC19に挿入し、このプラスミドをpXSP4と名付けた。この選抜したクローンについて、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI)、蛍光シーケンサー (ABI)を用いて全塩基配列を決定した (配列番号19参照)。得られた塩基配列からXSP4アミノ酸配列を予想した (配列番号20参照)。この結果からXSP4は15 kDaと予想できた。

*c、68℃、1min、72℃、2.5min、94℃、30sec、44℃、1min、72℃、2.5min)を15サイクル、(72℃、2.5min)を1サイクル)を行った。次に、プライマー12 (配列番号18)とプライマー10 (配列番号16)とを組み合わせ、前記のPCR反応産物希釈液を鋳型としてPCR反応 (94℃、30sec、64℃、1min、72℃、2.5min、94℃、30sec、64℃、1min、72℃、2.5min、94℃、30sec、44℃、1min、72℃、2.5min)を12サイクル、(72℃、2.5min)を1サイクル)を行った。さらにプライマー12 (配列番号18)とプライマー11 (配列番号17)とを組み合わせ、前記のPCR反応産物希釈液を鋳型としてPCR反応 (94℃、60sec、44℃、1min、72℃、2.5min)を20サイクル、(72℃、5min)を1サイクル)を行なったところ、約2000bpの増幅断片を得た。この産物をpT7Blueにクローニングして、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI)、蛍光シーケンサー (ABI)を用いて全塩基配列を決定した (配列番号1参照)。その結果、このクローン中には、XSP30上流領域、約1900bp (本発明プロモーター)が含まれていることが明らかとなった。

【0043】導管液中15 kDa相当のタンパク質バンドがXSP4タンパク質と予想できたので、導管液をアセトン濃縮し、300 μl相当の導管液をSDS-PAGEで解析した。15 kDaほどの位置のタンパク質バンドを確認し、このタンパク質をアクリルアミドゲルから切り出し、溶出バッファー (0.1 M酢酸ナトリウム、0.1% SDS、pH 8.5)中に溶出させた。プロテインシーケンサー377A (ABI)で、この溶出液に含まれるタンパク質 (XSP4)をN末端アミノ酸配列で解析したところ、配列番号21に示す通りの配列であった。これによりXSP4のシグナル配列が予想できた (配列番号22参照)。

【0044】The Plant Journal Vol.8, 457-463(1995)記載の方法により、TAIL-PCRを行い、XSP4の上流プロモーター領域のクローニングを行った。まず、得られたXSP4 cDNAの配列をもとにプライマー13 (配列番号23)、プライマー14 (配列番号24)、プライマー15 (配列番号25)を合成した。プライマー12 (配列番号18)とプライマー13 (配列番号23)とを組み合わせ、キュウリゲノムDNAを鋳型としてPCR反応 (93℃、1min、95℃、1min)を1サイクル、(94℃、1min、60℃、1min、72℃、2.5min)を5サイクル、(94℃、1min、25℃、3min、72℃まで3minで徐々に加温、72℃、2.5min)を1サイクル、(94℃、1min、68℃、1min、72℃、2.5min、94℃、30sec、68℃、1min、72℃、2.5min、94℃、30sec、44℃、1min、72℃、2.5

min) を15サイクル、(72℃、2.5 min) を1サイクル) を行った。次に、プライマー12 (配列番号18) とプライマー14 (配列番号24) とを組み合わせ、前記のPCR反応産物希釈液を鋳型としてPCR反応 (94℃、30 sec、64℃、1min、72℃、2.5 min、94℃、30 sec、64℃、1min、72℃、2.5 min、94℃、30 sec、44℃、1min、72℃、2.5 min) を12サイクル、(72℃、2.5 min) を1サイクル) を行った。さらにプライマー12 (配列番号18) とプライマー15 (配列番号25) とを組み合わせ、前記のPCR反応産物希釈液を鋳型としてPCR反応 (94℃、60 sec、44℃、1min、72℃、2.5 min) を20サイクル、(72℃、5min) を1サイクル) を行なったところ、約2000 bpの増幅断片を得た。

【0045】 Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI)、蛍光シーケンサー (ABI) を用いて塩基配列を決定した (配列番号2参照)。その結果、このクローン中には、プロモーター領域約2000 bp (本発明プロモーター) が含まれていることが明らかとなった。

プライマー13 : 5'-cctacacctccatattccagagccag-3' (配列番号23)

プライマー14 : 5'-tagcaccaacaccacaccataagg-3' (配列番号24)

プライマー15 : 5'-gatgtgtgtgatcataggtgagaag-3' (配列番号25)

【0046】 [実施例3] ノザンハイブリダイゼーションによるコーディング領域タンパク質の発現パターンの解析

播種後5週間のキュウリ茎部、葉部、根部、種子部、果実部、果皮部それぞれ20gからISOGEN (日本ジーン) を用いて全RNAを抽出し、約400μgのトータルRNAを調製した。このトータルRNA 20μg分を1.2%変性アガロースゲル電気泳動で分画し、20× SSC中、キャピラリープロット法でナイロンフィルターHybond-N (アマシャム) にプロットした。プロット後、フィルターを風乾し、80℃で2時間ベーキングすることによってRNAを固定した。このフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (10% 硫酸デキストラン、2× SSC、1% SDS) に浸して、60℃で2時間保温した。

【0047】 ランダムプライマー-DNAラベリングキットVer.2 (宝酒造) を用い、プラスミドDNAに [α -³²P] dCTPを添加することによってラベルを入れ、これをプローブに用い、ノザンハイブリダイゼーションを行った。イメージアナライザーで解析し、コーディング領域タンパク質遺伝子が根部でのみ高転写されていることを確認され、これらの遺伝子が根で高転写され、導管液中に分

泌されていることが確認された。

【0048】 [実施例4] 発現プラスミドの構築

(1) pXSP30から下記のプライマー16 (配列番号26)、プライマー17 (配列番号27) によりPCRでXSP30上流1.9kb領域を増幅し、この産物をpT7Blueにクローニングした。PCR反応増幅時にHindIII、BamHIの制限酵素サイトを導入した。このPCR増幅断片を制限酵素HindIII/BamHIで切断し、約2kbのDNA断片をアガロースゲルから切り出し、精製し、この断片を制限酵素HindIII/BamHIで消化したバイナリーベクターpB1101 (クローンテック製) に連結し、大腸菌JM109コンピテントセルにトランスフォームした。カナマイシン50μg/mlを添加したLBプレート上で選抜し、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製し、上記と同様に、コーディング領域内部についてシーケンスを行い、構造を確認した。このプラスミドをpXSP30UPと名付けた。

【0049】 一方、オワンクラゲ由来の GFP遺伝子が挿入されたpEGFP-N1 (クローンテック製) から下記のプライマー18 (配列番号28)、プライマー19 (配列番号29) によりPCRでGFP遺伝子部分を増幅した。PCR反応増幅時にBamHI、SacIの制限酵素サイトを導入した。このPCR増幅産物をpT7Blueベクターにクローニングし、このプラスミドをpXSP3030と名付けた。

【0050】 このプラスミドpXSP3030を制限酵素BamHI/SacIで切断し、約0.7 kbのDNA断片をアガロースゲルから切り出し、精製し、この断片を制限酵素BamHI/SacIで消化したpXSP30UPに連結し、大腸菌JM109コンピテントセルにトランスフォームした。カナマイシン50μg/mlを添加したLBプレート上で選抜し、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製し、上記と同様に、コーディング領域内部についてシーケンスを行い、構造を確認した。これにより、塩基置換がおこっていないこと、連結部とその周辺部の構造が変化していないことを確認した。得られたプラスミドをpXSP3038と名付けた (図1)。

このプラスミドは E.coli XL1 Blueに導入し、大腸菌 (E.coli) XL1-Blue (pXSP3038) として平成11年2月18日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番) に寄託した。そして、その寄託番号は FERM BP-6652 である。

【0051】 また、同様にしてプライマー20 (配列番号30) 及びプライマー19 (配列番号29) によりPCRでXSP30シグナルを付加しないGFP 遺伝子部分を増幅した。このPCR増幅産物をpT7Blueベクターにクローニングし、得られたプラスミドをpXSP3032と名付けた。同様にpXSP30UPと連結し、このXSP30シグナルを含まないプラスミドpXSP3040とした (図2)。

プライマー16 5'-ccggtatccccctttgattactttaattcgac-3' (配列番号26)

プライマー17 5'-ccaagcttttgagagtggttatttgggga-3' (配列番号27)

プライマー18

5'-aaggatccatgaagaagaattgtgttgagcatcatgtagccttctcactcaccaccaacttgccatcg

ccatggtgagcaagggcgaggag-3' (配列番号28)

プライマー19 5'-cccgaggagctctctagattactgtacagctcgtccatgccag-3'

(配列番号29)

プライマー20 5'-aaggatccatggtgagcaagggcgaggag-3' (配列番号30)

【0052】(2)(1)と同様に、pEGFP-N1(クローンテック製)からプライマー18(配列番号28)、プライマー19(配列番号29)によりPCRでGFP遺伝子部分を増幅した。PCR反応増幅時にBam HI、Sac Iの制限酵素サイトを導入した。このXSP30シグナル配列及びGFP遺伝子産物をカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター及びそのエンハンサーを含むDNA断片(EI2Ω)(Plant cell Physiol., 37, 49~59(1996))の下流、Bam HI、Sac Iの制限酵素サイトに挿入し、EI2Ωプロモーター、XSP30シグナル配列及びGFP遺伝子部分を連結した。このプラスミドをpXSP3046と名付けた(図3)。

【0053】また、(1)と同様にしてプライマー20(配列番号30)及びプライマー19(配列番号29)によりPCRでXSP30シグナルを付加しないGFP遺伝子部分を用い、EI2Ωの下流に配置した。このXSP30シグナルを含まないプラスミドpXSP3048とした(図4)。カナマイシン50μg/mlを添加したLBプレート上で選抜し、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製し、上記と同様に、コーディング領域内部についてシークエンスを行い、構造を確認した。これにより、塩基置換がおこっていないこと、連結部とその周辺部の構造が変化していないことを確認した。

【0054】(3) pXSP4から下記のプライマー21(配列番号31)、プライマー22(配列番号32)によりPCRでXSP4上流1.9kb領域を増幅し、この産物をpT7Blueにクローニングした。PCR反応増幅時にHind III、Bam HIの制限酵素サイトを導入した。このPCR増幅産物を制限酵素Hind III/Bam HIで切断し、アガロースゲルから切り出し、精製し、この断片を制限酵素Hind III/Bam

プライマー23

5'-aaggatccatgaaagaaattgtgttgagcatcattgttagccttctcactcaccacccaacttgccatcg

ccgatgcacacaagagtgggttgct -3' (配列番号33)

プライマー24 5'-cccgaggagctctctagattataagcctaaggcagcttgacttgc-3'

(配列番号34)

【0058】(5)(4)と同様に、ヒト肝臓cDNAライブラリー(東洋紡製)から下記のプライマー23(配列番号33)、プライマー24(配列番号34)によりPCRで、XSP30シグナル配列及びヒト血清アルブミン成熟タンパク質をコードする遺伝子部分を増幅した。このXSP30シグナル配列及びヒト血清アルブミン遺伝子PCR増幅産物をpBI101のBam HI、Sac Iサイトに挿入した。さらにEI2Ωを上流Hind III、Bam HIサイトに連結した。このプラスミドをpCAMVALBと名付けた(図7)。

【0059】カナマイシン50μg/mlを添加したLBプレート上で選抜し、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製し、上記と同様に、コーディング領域内部につ

*HIで消化したバイナリーベクターpBI101(クローンテック製)に連結し、大腸菌JM109コンピテントセルにトランスフォームした。得られたプラスミドをpXSP4UPと名付けた。

【0055】(1)と同様に(1)で増幅したGFP遺伝子部分をBam HI/Sac Iサイトに連結した。カナマイシン50μg/mlを添加したLBプレート上で選抜し、生育してきたクローンからプラスミドDNAを調製し、上記と同様に、コーディング領域内部についてシークエンスを行い、構造を確認した。これにより、塩基置換がおこっていないこと、連結部とその周辺部の構造が変化していないことを確認した。得られたプラスミドをpXSP403と名付けた(図5)。

プライマー21 5'-ccggatccatttggagaagggatgcctt-3'

(配列番号31)

20 プライマー22 5'-ccaagcttgatgatgggtggcagaggtga-3'

(配列番号32)

【0056】(4)ヒト肝臓cDNAライブラリー(東洋紡製)から下記のプライマー23(配列番号33)、プライマー24(配列番号34)によりPCRで、XSP30シグナル配列とヒト血清アルブミン成熟タンパク質をコードする遺伝子部分を増幅した。このヒト血清アルブミン遺伝子PCR増幅産物を(1)のpXSP30UPのBam HI/Sac Iサイトに挿入し、ヒト血清アルブミン遺伝子部分を連結した。このプラスミドをpXSP30ALBと名付けた(図6)。

【0057】上記と同様に、コーディング領域内部についてシークエンスを行い、構造を確認した。これにより、塩基置換がおこっていないこと、連結部とその周辺部の構造が変化していないことを確認した。

いてシークエンスを行い、構造を確認した。これにより、塩基置換がおこっていないこと、連結部とその周辺部の構造が変化していないことを確認した。

【0060】(実施例5) GFP導入植物体の作製

(1) 無菌播種

キュウリ(Cucumis sativus L.)の完熟種子約30粒の外皮殻をカッターナイフで剥離してから、有効塩素濃度1%に希釈したアンチホルミン消毒液で15分間浸漬処理をし、種子表面の無菌化処理を行った。次に滅菌蒸留水で3回の洗浄を行い、シャーレ固形培地上に播種した。培地は、MS培地(T. Murashige and F. Skoog, Physiol. Plant, 15, 473 (1962))を基本とした播種後、遮光し、

28℃のインキュベータ中で24時間培養した。

【0061】(2) アグロバクテリウム菌液の接種
L培地中、28℃で一晩振とう培養したアグロバクテリウム菌を、新たなL培地に植え継ぎ、OD₆₀₀=0.6になるまで培養した。この培養液から遠心して菌体を集め、冷やしておいた滅菌蒸留水で懸濁後、再度遠心して集菌した。この洗いを2度繰り返し、さらに滅菌蒸留水をグリセロール溶液に変えて同様の操作を行った。こうして得られた菌体を最終的に400倍になるように10%グリセロール溶液に懸濁した。このコンピテントセルに上記で構築したTiプラスミド発現ベクター(pXSP3038、pXSP3040、pXSP3046、pXSP3048、pXSP403、pXSP30ALB、pCAMVALB)を、エレクトロポレーション法を用いて導入し、カナマイシン50μg/mlを含むLプレート上で選抜した。生育してきたカナマイシン耐性クローンの中からアルカリSDS法によりプラスミドDNAを調製し、1.0%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色により、Tiプラスミド発現ベクター(pXSP3038、pXSP3040、pXSP3046、pXSP3048、pXSP403、pXSP30ALB、pCAMVALB)が導入されていることを確認した。

【0062】トランスジェニックキュウリの作製は、Ta
bei, Y. et al. Jpn. J. Breed., 40(suppl. 2): 186-*

(プライマー17 配列番号27) 5'-ccaagctttggagtgggtattttggga-3'

(プライマー25 配列番号35) 5'-ttacttgtacagctcgtccat-3'

さらにGFP遺伝子内部とNOSターミネーター内部の組合せ

(プライマー20 配列番号30) 5'-aaggatccatggtgagcaagggcgaggag-3'

(プライマー26 配列番号36) 5'-catgcttaacgtaattcaacag-3'

を用いてPCR 反応 (94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を1
サイクルとして40サイクル) を行い、PCR 産物の一部を
0.8%アガロースゲル電気泳動で分画し、目的とするDNA
断片 (導入遺伝子) の増幅を確認した。

(プライマー17 配列番号27) 5'-ccaagctttggagtgggtattttggga-3'

(プライマー27 配列番号37) 5'-acttcatcaaaaggacagta-3'

さらにGFP遺伝子内部とNOSターミネーター内部の組合せ

(プライマー20 配列番号30) 5'-aaggatccatggtgagcaagggcgaggag-3'

(プライマー26 配列番号36) 5'-catgcttaacgtaattcaacag-3'

を用いてPCR 反応で同様に確認した。

【0065】pXSP403を形質転換したトランスジェニ
ックキュウリについてはこのDNA 50ngを鋳型に

(プライマー22 配列番号32) 5'-ccaagcttgatgatgggtggcagaggtga-3'

(プライマー25 配列番号35) 5'-ttacttgtacagctcgtccat-3'

さらにGFP遺伝子内部とNOSターミネーター内部の組合せ

(プライマー19 配列番号29) 5'-cccgaggagctctctagattacttgtacagctcgtcca
atgccag-3'

(プライマー26 配列番号36) 5'-catgcttaacgtaattcaacag-3'

を用いてPCR 反応で同様に目的とするDNA 断片 (導入遺
伝子) の増幅を確認した。

【0066】pXSP30ALBを形質転換したトランスジェ
ニックキュウリについてはこのDNA 50ngを鋳型にし、プラ

(プライマー16 配列番号26) 5'-cggatccctttgattactttaattcgac-3'

*187 (1990)に記載してある方法に準じて行った。カナマ
イシン100μg/mlを含むL液体培地中、28℃、1晩振とう
培養した上記のTiプラスミド導入アグロバクテリウム菌
液に外植片を5分間浸漬した後、抗生物質を含まない M
S-BA (再分化培地) に移して、25℃、暗黒条件下で3日
間共存培養した。除菌後、外植片をMS-BAC培地に移植
し、不定芽の伸長を促すと同時に、MS-BAC培地でカナ
マイシンによる形質転換体の選抜を行った。茎葉の緑色
を保ち、順調に生育した再分化個体をMS-CK培地に挿し
芽により増殖させた後、隔離温室で順化し、順化個体数
が確保できた系統について形質転換体の確認を行った。
さらにMS-CK 培地に植え継ぎ、発根させた。

【0063】(3) 本発明植物体における形質転換体の
確認

得られたそれぞれのトランスジェニックキュウリの葉4
5枚をとって、CTAB法によりゲノムDNA を調製した。pXS
P3038、pXSP3040を形質転換したトランスジェニックキ
ュウリについてはこのDNA 50ngを鋳型にし、プライマー
としてレポーター遺伝子であるGFP 遺伝子の内部とGFP
遺伝子のATG から2000bp上流付近 (本発明プロモーター
内部) の組合せ、

※【0064】pXSP3046、pXSP3048を形質転換したラン
スジェニックキュウリについてはこのDNA 50ngを鋳型に
し、プライマーとしてレポーター遺伝子であるGFP 遺伝
子の内部とEI2Ω内部の組合せ、

★し、プライマーとしてレポーター遺伝子であるGFP
遺伝子の内部とGFP遺伝子のATG から2000 bp 上流付近
(本発明プロモーター内部) の組合せ、

イマーとしてヒト血清アルブミン遺伝子の内部とヒト血
清アルブミン遺伝子上流 (本発明プロモーター内部)
の組合せ、

(プライマー-28 配列番号38) 5'-agcaacctcactcttgtgtgc-3'

さらにヒト血清アルブミン遺伝子内部とNOSターミネー ター内部の組合せ

(プライマー-23 配列番号33)

5'-aaggatccatgaagaattgtgttgagcatattgtagccttctcactcaccacccaacttgccatcg
ccgatgcacacaagagtgaggttgct -3'

(プライマー-26 配列番号36) 5'-catgcttaacgtaattcaacag-3'

を用いてPCR 反応 (94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を1 サイクルとして40サイクル) を行い、PCR 産物の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動で分画し、目的とするDNA 断片 (導入遺伝子) の増幅を確認した。

* 【0067】 pCAMVALBを形質転換したトランスジェニッ クキュウリについてはこのDNA50ngを鋳型にし、プライ マーとしてヒト血清アルブミン遺伝子の内部とヒト血清 * 10 アルブミン遺伝子上流 (E12Ω内部) の組合せ、

(プライマー-27 配列番号37) 5'-acttcatcaaaagacagta-3'

(プライマー-28 配列番号38) 5'-agcaacctcactcttgtgtgc-3'

さらにヒト血清アルブミン遺伝子内部とNOSターミネー ター内部の組合せ

(プライマー-23 配列番号33)

5'-aaggatccatgaagaattgtgttgagcatattgtagccttctcactcaccacccaacttgccatcg
ccgatgcacacaagagtgaggttgct -3'

(プライマー-26 配列番号36) 5'-catgcttaacgtaattcaacag-3'

を用いてPCR 反応 (94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 3分を1 サイクルとして40サイクル) を行い、PCR 産物の一部を 0.8%アガロースゲル電気泳動で分画し、目的とするDNA 断片 (導入遺伝子) の増幅を確認した。

た。pXSP30ALB及びpCAMVALBを形質転換したカナマイシ ン耐性を示すトランスジェニックキュウリの個体を1ヶ 月生育させた。葉部を含まないように地上部10 cmのと ころで切断し、導管液の最初の数滴を捨て、切断表面を 滅菌水で洗浄した後、チューブを茎につなぎ、導管液を 氷中のチューブに回収した。この導管液をアセトン濃縮 し、300 μl相当の導管液をSDS-PAGEで解析した。抗ヒ ト血清アルブミン抗体を用いたウエスタンブロットの結 果、60 kDaほどの位置にヒト血清アルブミンタンパク質 に相当するバンドを確認し、本発明植物体における異種 タンパク質の分泌の確認ができた。

【0068】 (4) 植物体における異種タンパク質分泌 の確認

pXSP403及びpXSP3038、pXSP3046を形質転換したカナマ イシン耐性を示すトランスジェニックキュウリの個体を 1ヶ月生育させた。葉部を含まないように地上部10 cm のところで切断し、導管液の最初の数滴を捨て、切断表 面を滅菌水で洗浄した後、チューブを茎につなぎ、導管 液を氷中のチューブに回収した。この導管液をアセトン 濃縮し、300 μl相当の導管液をSDS-PAGEで解析した。 抗GFP抗体を用いたウエスタンブロットの結果、15 kDa ほどの位置にGFPタンパク質に相当するバンドを確認 し、本発明植物体における異種タンパク質分泌の確認が できた。

【0070】
【発明の効果】本発明により、植物に係わる遺伝子組換 え技術を用いて植物導管液中に外来ペプチドを効率よく 分泌生産する方法およびそれら方法に用いるプロモータ ー、シグナルペプチド等が提供された。そして、本発明 の方法により、外来ペプチドを効率よく生産することが できるので、本発明は産業上極めて有用である。

【0069】一方、コントロールとして、シグナル配列 を含まないpXSP3040、pXSP3048を形質転換したカナマイ シン耐性を示すトランスジェニックキュウリでは導管液 中にGFPタンパク質に相当するバンドを確認できなかつ

【0071】
【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Noda Institute for Scientific Research

<120>A process for producing polypeptides in plant apoplast

<130>P98-0674

<160>38

<210>1

<211>2030

<212>DNA

<213>Cucumis sativus

<400>1

```

agtcgagtga gatgaaaaag gaaaccacat ggagagtggg tatttgggga agaacatgaa 60
aataacacga agaaaaagga aatcacgtgg aaaaatggaa aaggaaatag aaaaataatt 120
gagaaaaaga gaaatgaaac aattaaaaat aattgagaaa aatgaaaaga aaatcaataa 180
aaataatiga gaaaaaggaa aagaaaactg ataaaaataa ttgagaaaaa ggaaaggaaa 240
ccgataaaaa taattgagat aaaaaacgaa aaggaaacca acagaaataa ttaagaaaaa 300
ggaagaggaa aagaaatcca ataaaaataa ttgagaaacg gaataggaga aactattttt 360
tttcccaata atlccattata aaattagaaa tgttictact ttttttagga cgagaaatag 420
gaaacgttac caaagacctc tattgtttct tagaaaaatg aaaacagaaa cataaaacgg 480
aaaaocgagaa tgttaccaaa cgactttata aatttttcat ttgtaagttc gaatccattc 540
aattatattt tcactttggg ttaatttttg gtgattccaa aatttaaaaa tataatataa 600
ttgagaaaaa ggaaaagaaa atcgataaaa gtaatttttt aaaaaaaga aaagaaaact 660
gataaaaaata atcgagagaa tggaaaataa accgataaaa ataattgaga aaaaagaaaa 720
gaaaattgat aaaaataatt gagaaaatgg aaaagaaaaa ggaaccaat aaaaataatt 780
gagaaacaga actaaagaaa atattttttt ctcccaataa cctttttata aaattccaaa 840
cgtttctatt tttaaagaaa caagaaccag cacctgtgct tactagacat gttctaagtc 900
ttaagttaga aaacatacat gtgcaataag agctagaag gttgagtatt atcggtgact 960
tataattttt taaataatca tgatgtattt atagatataa ttgacttata acctttctct 1020
taggtatgtt aittgcattt gacttatcct ttctagggtt aaccttttgc tataattatg 1080
gcttaagata aacctttgga tgaggcatgt tctagcagac attttgtcaa tttttctgat 1140
cggacatgct agtttaggcc aagtcctgtc aaactaatc ctatcactag gtccattttg 1200
atcatatgcc atgttgccac ttctgactca aattatata tctcttctta acctctgta 1260
tctcttctct ataatgtca atattatgtc tcaccatcgg ttcccttgta caataattat 1320
cccaaaattt atcatcacat tatacccat aaatctttcg taagagatat tatcctagaa 1380
aagtatgctt atagggttg aaaaatcttc tattaagtag gtacaaaagt agtgaaataa 1440
aattcaaat tatatgttta ctgtcatggc caatgtaaca acaaaaaata ataattgata 1500
aacaatgtct atattaaata ataaatagag taagataaat caaaatattt ataatatag 1560
caataattta ctttttactt acgatagatc gtggttgact aatttctatg ttttaatggg 1620
tctatatata ataatttaaa gataataaat tgtgatattt tgttatattt ataaatattt 1680
ttaatcacat ttaaaacaaa tticcattca ctccactaaa ctatgaattt catcctaatt 1740
accactgcaa aatglaacaa aaagticaaa ccaatgggga gagtttatgt gtatactcat 1800
cccataaac aaccccatcc atiggaagaa caattatgga ttgtgattc atcatccccc 1860
actacaataa tttttttgtt gatccttttt aattagaata ataatgcttg ttccattcat 1920
aattgtccac tgggctagcc ttctgttgta ttttgtgtgt atatataccc cttcattcta 1980
gccaactttt gtcaaacaaa tatatatagt cgaattaaag taatcaaagg 2030

```

<210>2

<211>1835

<212>DNA

<213>Cucumis sativus

<400>2

```

gttcgagtca gatgttggat gaattttgtt cgaataaaaa ttaaaacaac ttattgttat 60
caacttataa gttatatata tgatgatgtt ggtgcagagg tgaaaactta gtttgagatc 120
tctccctaca tctactatgc tttaacgttc taatgtattt tgtggtaaaa aaatcaatta 180
taaacittta agaaaaattt tcataigtta ttattttttc tctaaattct aaactagcca 240
ggttatcaac aaaacaaata ccactagagt ttaagggatt aggaagcata tatgaatc 300
tcaacttggg taacacgtcg tttttaaaca ttctcatca ggttgctgtt tcaaaagtga 360

```

25

26

```

tgcactgatg tgaagaaaca tataggagaa aagtgaagtgg aaagttagta tattggacag 420
agtacatagt acatagtagg ttattatttta atttatccaa tgataatctc cttaccagca 480
ctatgtgatg tagatatgga taaaatgtga tcatttttcc accactatta catagcaaat 540
gggaaaacat ctcattgtgg ttgatatttt taaaaaaca ttatggtaat gccagtcgtc 600
tcataatcca taatattatc tcagtctcat ggcgactgat acaaaaggac aaaactaact 660
tcattaaaat atgttctctc cttctacac ttttaggta tataatcattc atatattaat 720
cactgcaatt ggttaggtgg actacaaaaa catagatata gtccgagata aaattaagta 780
cggttatatt ttacgagact ttgatgtgt ttgattacat tttcatgtgt ttcttttaga 840
aaataagtta ttttgaaaaa actaaagta tttaaacaat ttttagaaca atcaatttct 900
tgaaaaatat tttttctta attcaatcta agatggatcc tcaaaatatt tgagggtagt 960
tcitttataa aagtatttac actaggttgg tttatgaagt aaaatattga tcggtaaatt 1020
caagttttta attagaaaaa ttgaatatit ctaaaaatag aagaattggc taactattta 1080
caactcatat caaaatttta atacaaatcc aaagtatcta tttttatttt tattattatt 1140
attatttttt gctataggat gtaaatacta cctgttttct tgtaaatttc tcttacaatc 1200
ctctacgaga aagtcittaat ttttatattt atgatttata ttataatata attatttggg 1260
accatataat aaataaaagg aaaattgtaa aacataacat ttgacaaaat atcttcgtag 1320
aaaaatttgt tgtgtaatca attttgaggt tttgttatat ggagcgtaaa tattttgtca 1380
aattttctat ttgtgaaaaa aaaacttata ggtaatttga aaggtaagtg atcttgttta 1440
agatccaaat ttcttttatg aaagtttaat ttagaataca tacgagaaaa atagattaat 1500
ctagaatgat aaatgtaaga taggtttggg aagtaccaat aattttaggg atgtgataga 1560
ctataactgt gaagatatat agtctattgc tatcttgatg gctcattctt gtttgaaaat 1620
gaccttattt aaaacacaac ttttttataa agaaatccct tgcattcattc aaacaatctt 1680
acagatcgta ttagtggaag atgagataga attctgacat gtgtattatt agtatacttg 1740
aatagtttct tatctaactt ttgagcaagt agtggagaag ctgatcatga accctaaacc 1800
caccgtatca ttcactatat aaaggagatc actac 1835

```

<210>3

<211>21

<212>PTN

<213>Cucumis sativus

<400>3

Met Lys Glu Ile Val Leu Ser Ile Ile Val Ala Phe Ser Leu Thr

5

10

15

Thr Gln Leu Ala Ile Ala

20

<210>4

<211>25

<212>PTN

<213>Cucumis sativus

<400>4

Val Pro Pro Asn Tyr Gly Tyr Gly Val Gly Tyr Gly Gly Val Pro

5

10

15

Gly Ala Thr His Leu Val Gly Arg Asp Gly

20

25

<210>5

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA(sense) degenerated from the N-terminal amino acid sequence for amplification of a part of cDNA

<220>

<221> modified_base

<222> 3

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 6

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 9

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 18

<223> n represents a, g, c or t

<400>5

gtncnnggna aytayggnta ygg

<210>6

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA(sense) degenerated from the N-terminal amino acid sequence for amplification of a part of cDNA

<220>

<221> modified_base

<222> 6

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 9

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 12

<223> n represents a, g, c or t

29

30

<220>

<221> modified_base

<222> 18

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 21

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 24

<223> n represents a, g, c or t

<400>6

tayggngtng gntayggngg ngtncc

<210>7

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of a part of XSP30 cDNA in the 3' RACE

<400>7

cagaagaatg acggaaccat a

<210>8

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for a reverse transcription of a part of XSP30 cDNA

<400>8

agaagtcaag caatagtttt t

<210>9

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of a part of XSP30 cDNA in the 1st step of 5' RACE

<400>9

aaaaacttca gcagccaa

<210>10

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of a part of XSP30 cDNA in the 1st step of 5' RACE

<400>10

ggggtcataa ataaagca

<210>11

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of a part of XSP30 cDNA in the 2nd step of 5' RACE

<400>11

agcaaaattt atcattca

<210>12

<211>18

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of a part of XSP30 cDNA in the 2nd step of 5' RACE

<400>12

gtagtaagtg agtgtggt

<210>13

<211>1065

<212>DNA

<213>Cucumis sativus

<400>13

```

atagtgaat taagtaatc aaaggatgaa agaaattgtg ttgagcatca ttgtagcctt   60
ctcactcacc acccaacttg ccatcgagtg gcccccaac tatggatatg gagttggata  120
tggaggcgtc cctggagcca cacatcttgt gggtcgagat ggatttgttt tagagatgtc  180
tccatggtac aaacctgcag gtattaattt tccaactcga ttatcaccat gtgacgagaa  240
g a a c a a a c t c a a t t a t g g a c g a t t g t c g g a g a
t g g c a c a a t t c g a c c c a t g a a t g a t a a   300
a t t t t g c t t g g c t g c t g a a g t t t t t t a t g g g g t
c a t a a a t a a a g c a g t a g t a a g t g a g t g   360
t g g t a a a g t a t c a g a t c c t a a c a a g a a a t g g a c
c c a g a a g a a t g a c g g a a c c a t a g c c c t   420
c g t c g a t t c a a g a a t g g t t c t a a c a g g a g a t t t
a g a c t a t g t g a c a t t g c a a a g t a a c a a   480
a t a t a c a c c a t c a c a a a g t t g g g a a g t c a c g g a
a a g t t t a a a c t c a a t g g t t g c a a a c a t   540
c g a a t g g c t t a a c a a c t t g t g t t t g c a a t c c a c
a g a c g a t t c a a g t c a t g t g g g a t t g a a   600
t g g a t g t a a t a c a g a c a a t a a g t a c c a a a g a t g

```

33

34

```

ggcattg tatgcagatg gaaccattcg 660
acaacatgtg aacaaaaact attgcttgac ttc
tgaccaa gatttttggtc gctttgtagt 720
tgtgtctaaa tgtgaagaca aaccgcaaca acg
ttggagt cttgatgcta aagactatac 780
tattgaccat cccaacactg acatggtcct aga
tgtgtttt agtgtgcctg attctacttt 840
tccgtcagta ctcgttacga accgtcgtga tgg
aagtgct agccaaagat ggactattat 900
taactaatga atcagataaa taagataggg gag
atgtgaa tccacacgaa ctcatgcatg 960
caaatgcctt tctacttctt taactctctt tct
aatgctt aatgtatgaa catcaataaa 1020
ttaataagat aagtgtggat ttatgtgttt aaa
aaaaaaaa aaaaaa 1065

```

<210>14

<211>293

<212>PRT

<213>Cucumis sativus

<400>14

```

Met Lys Glu Ile Val Leu Ser Ile Ile Val Ala Phe Ser Leu Thr
      5              10              15
Thr Gln Leu Ala Ile Ala Val Pro Pro Asn Tyr Gly Tyr Gly Val
      20              25              30
Gly Tyr Gly Gly Val Pro Gly Ala Thr His Leu Val Gly Arg Asp
      35              40              45
Gly Leu Cys Leu Glu Met Ser Pro Trp Tyr Lys Pro Ala Gly Ile
      50              55              60
Asn Phe Pro Thr Arg Leu Ser Pro Cys Asp Glu Lys Lys Gln Thr
      65              70              75
Gln Leu Trp Thr Ile Val Gly Asp Gly Thr Ile Arg Pro Met Asn
      80              85              90
Asp Lys Phe Cys Leu Ala Ala Glu Val Phe Tyr Gly Val Ile Asn
      95              100             105
Lys Ala Val Val Ser Glu Cys Gly Lys Val Ser Asp Pro Asn Lys
      110             115             120
Lys Trp Thr Gln Lys Asn Asp Gly Thr Ile Ala Leu Val Asp Ser
      125             130             135
Arg Met Val Leu Thr Gly Asp Leu Asp Tyr Val Thr Leu Gln Ser
      140             145             150
Asn Lys Tyr Thr Pro Ser Gln Ser Trp Glu Val Thr Glu Ser Leu
      155             160             165
Asn Ser Met Val Ala Asn Ile Glu Trp Leu Asn Asn Leu Cys Leu
      170             175             180
Gln Ser Thr Asp Asp Ser Ser His Val Gly Leu Asn Gly Cys Asn
      185             190             195
Thr Asp Asn Lys Tyr Gln Arg Trp Ala Leu Tyr Ala Asp Gly Thr
      200             205             210

```

35

36

Ile Arg Gln His Val Asn Lys Asn Tyr Cys Leu Thr Ser Asp Gln		
215	220	225
Asp Phe Gly Arg Phe Val Val Val Ser Lys Cys Glu Asp Lys Pro		
230	235	240
Gln Gln Arg Trp Ser Leu Asp Ala Lys Asp Tyr Thr Ile Asp His		
245	250	255
Pro Asn Thr Asp Met Val Leu Asp Val Phe Ser Val Pro Asp Ser		
260	265	270
Thr Phe Pro Ser Val Leu Val Thr Asn Arg Arg Asp Gly Ser Ala		
275	280	285
Ser Gln Arg Trp Thr Ile Ile Asn		
290	293	

<210>15

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30 in the TAIL-PCR

<400>15

tcttctgggt ccatttcttg ttagg

<210>16

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30 in the TAIL-PCR

<400>16

ctttccgtga cttccaact ttgtg

<210>17

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30 in the TAIL-PCR

<400>17

cgtcacatgg tgataatcga gttgg

<210>18

<211>16

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30 in the TAIL-PCR

37

38

<220>

<221> modified_base

<222> 1

<223> n represents a, g, c or t

<220>

<221> modified_base

<222> 11

<223> n represents a, g, c or t

<400>18

ngtcgaswga nawgaa

<210>19

<211>504

<212>DNA

<213>Cucumis sativus

<400>19

```

atgcattcta aggcattccct tctccaaatg gctatcttta gaactttctc ttccggtttt 60
cttttgttgg tgagtttagg cttagcttct gcgaccagaa gtcttctcac ctatgatcca 120
ccacatcact cigtatatga tgatcataac actaaagtag gttacggacg tgaccatcat 180
gatcaacctt atggtggtgg tgttggtgct agtggaggat atggagccgg agctggctct 240
ggatatggag gtgtaggata cgaacatgac catcatgatg gatacgaacg tgatcatgat 300
cgaatcttatg gtggtagtgc tggtaggagga tatggagtig gagctggctc ctctcttggg 360
ggctctggat atggaaacgt agatcatggg gttggttata gcaatggtag aagtgggtgga 420
tatggagctg gtgtggctc tgaccttggg ggtagcggat atggaagcgg taatggcgga 480
caagtgaag tggaaatggt gatt 504

```

<210>20

<211>168

<212>PRT

<213>Cucumis sativus

<400>20

```

Met His Ser Lys Ala Ser Leu Leu Gln Met Ala Ile Phe Arg Thr
      5              10              15
Phe Ser Phe Gly Phe Leu Leu Leu Val Ser Leu Gly Leu Ala Ser
      20              25              30
Ala Thr Arg Ser Leu Leu Thr Tyr Asp Pro Pro His His Ser Val
      35              40              45
Tyr Asp Asp His Asn Thr Lys Val Gly Tyr Gly Arg Asp His His
      50              55              60
Asp Gln Pro Tyr Gly Gly Gly Val Gly Ala Ser Gly Gly Tyr Gly
      65              70              75
Ala Gly Ala Gly Ser Gly Tyr Gly Gly Val Gly Tyr Glu His Asp
      80              85              90
His His Asp Gly Tyr Glu Arg Asp His Asp Arg Ser Tyr Gly Gly
      95              100             105
Ser Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Val Gly Ala Gly Ser Ser Leu Gly

```

110 115 120
 Gly Ser Gly Tyr Gly Asn Val Asp His Gly Val Gly Tyr Ser Asn
 125 130 135
 Gly Gly Ser Gly Gly Tyr Gly Ala Gly Val Gly Ser Asp Leu Gly
 140 145 150
 Gly Ser Gly Tyr Gly Ser Gly Asn Gly Gly Gln Val Glu Val Glu
 155 160 165
 Met Val Ile
 168

<210>21
 <211>10
 <212>PRT
 <213>Cucumis sativus

<400>21
 Thr Arg Ser Leu Leu Thr Tyr Asp Pro Pro
 5 10

<210>22
 <211>31
 <212>PRT
 <213>Cucumis sativus

<400>22
 Met His Ser Lys Ala Ser Leu Leu Gln Met Ala Ile Phe Arg Thr
 5 10 15
 Phe Ser Phe Gly Phe Leu Leu Leu Val Ser Leu Gly Leu Ala Ser
 20 25 30
 Ala
 31

<210>23
 <211>25
 <212>DNA
 <213>Artificial Sequence
 <223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of
 XSP4 in the TAIL-PCR

<400>23
 cctacacctc catatccaga gccag

<210>24
 <211>24
 <212>DNA
 <213>Artificial Sequence
 <223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of
 XSP4 in the TAIL-PCR

<400>24

tagcaccaac accaccacat aagg

<210>25

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP4 in the TAIL-PCR

<400>25

gatgtggtgg atcataggtg agaag

<210>26

<211>30

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30

<400>26

ccggatcccc tttgattact ttaattcgac

<210>27

<211>29

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30

<400>27

ccaagctttg gagagtgggt atttgggga

<210>28

<211>92

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of GFP gene

<400>28

aaggatccat gaaagaaatt gtgtgagca tcattgtagc cttctcactc accaccaac
ttgccatgc catggtgagc aagggcgagg ag

<210>29

<211>44

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of GFP gene

<400>29

ccggggagct ctctagatta cttgtacagc tctccatgc cgag

<210>30
<211>29
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<223>Designed DNA for amplification of GFP gene

<400>30
aaggatccat ggtgagcaag ggcgaggag

<210>31
<211>28
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of
XSP 4

<400>31
ccggatccat ttggagaagg gatgcctt
<210>32
<211>30
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of
XSP4

<400>32
ccaagcttga tgaagggtgt gcagaggtga

<210>33
<211>95
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<223>Designed DNA for amplification of a human serum albumin gene

<400>33
aaggatccat gaaagaaatt gtgttagca tcattgtagc ctctcactc accaccaac
ttgccatgc cgatgcacac aagagtgagg ttgct

<210>34
<211>44
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<223>Designed DNA for amplification of a human serum albumin gene

<400>34
cccgaggagct ctctagatta taagcctaag gcagcttgac ttgc

<210>35
<211>21

45

46

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of an upstream promoter region of XSP30

<400>35

ttacttgtac agctgtcca t

<210>36

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of GFP gene

<400>36

catgcttaac gtaattcaac ag

<210>37

<211>20

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of CaMV35S promoter region

<400>37

acttcatcaa aaggacagta

<210>38

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<223>Designed DNA for amplification of CaMV35S promoter region

<400>38

agcaacctca ctcttgttg c

【0072】

【配列表フリーテキスト】配列番号5：XSP30のN末端アミノ酸配列をもとに、設計されたDNA。

配列番号5：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：3）。

配列番号5：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：6）。

配列番号5：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：9）。

配列番号5：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：18）。

【0073】配列番号6：XSP30のN末端アミノ酸配列をもとに、設計されたDNA。

配列番号6：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：6）。

配列番号6：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：9

）。

配列番号6：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：12）。

配列番号6：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：18）。

40 配列番号6：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：31）。

配列番号6：nはa, g, c又はtを表す（存在位置：34）。

【0074】配列番号7：3' RACE法により、XSP30のcDNAの一部を増幅するために設計されたDNA。

配列番号8：5' RACE法により、XSP30のmRNAをcDNAに逆転写するために設計されたDNA。

配列番号9：5' RACE法（1st step）により、XSP30のcDNAの一部を増幅するために設計されたDNA。

50 配列番号10：5' RACE法（1st step）により、XSP30のc

DNAの一部を増幅するために設計されたDNA。

【0075】配列番号11：5'RACE法(2st step)により、XSP30のcDNAの一部を増幅するために設計されたDNA。

配列番号12：5'RACE法(2st step)により、XSP30のcDNAの一部を増幅するために設計されたDNA。

配列番号15：TAIL-PCR法により、XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

【0076】配列番号16：TAIL-PCR法により、XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。 10

配列番号17：TAIL-PCR法により、XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号18：TAIL-PCR法により、XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号18：nはa, g, c又はtを表す(存在位置：1)。

配列番号18：nはa, g, c又はtを表す(存在位置：11)。

【0077】配列番号23：TAIL-PCR法により、XSP4の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。 20

配列番号24：TAIL-PCR法により、XSP4の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号25：TAIL-PCR法により、XSP4の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号26：XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号27：XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

【0078】配列番号28：GFP遺伝子を増幅するため

に設計されたDNA。

配列番号29：GFP遺伝子を増幅するために設計されたDNA。

配列番号30：GFP遺伝子を増幅するために設計されたDNA。

配列番号31：XSP4の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号32：XSP4の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号33：ヒト血清アルブミン遺伝子を増幅するために設計されたDNA。

【0079】配列番号34：ヒト血清アルブミン遺伝子を増幅するために設計されたDNA。

配列番号35：XSP30の上流プロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号36：GFP遺伝子を増幅するために設計されたDNA。

配列番号37：CaMV35Sプロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

配列番号38：CaMV35Sプロモーター領域を増幅するために設計されたDNA。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は発現ベクターpXSP3038の構築図である。

【図2】図2は発現ベクターpXSP3040の構築図である。

【図3】図3は発現ベクターpXSP3046の構築図である。

【図4】図4は発現ベクターpXSP3048の構築図である。

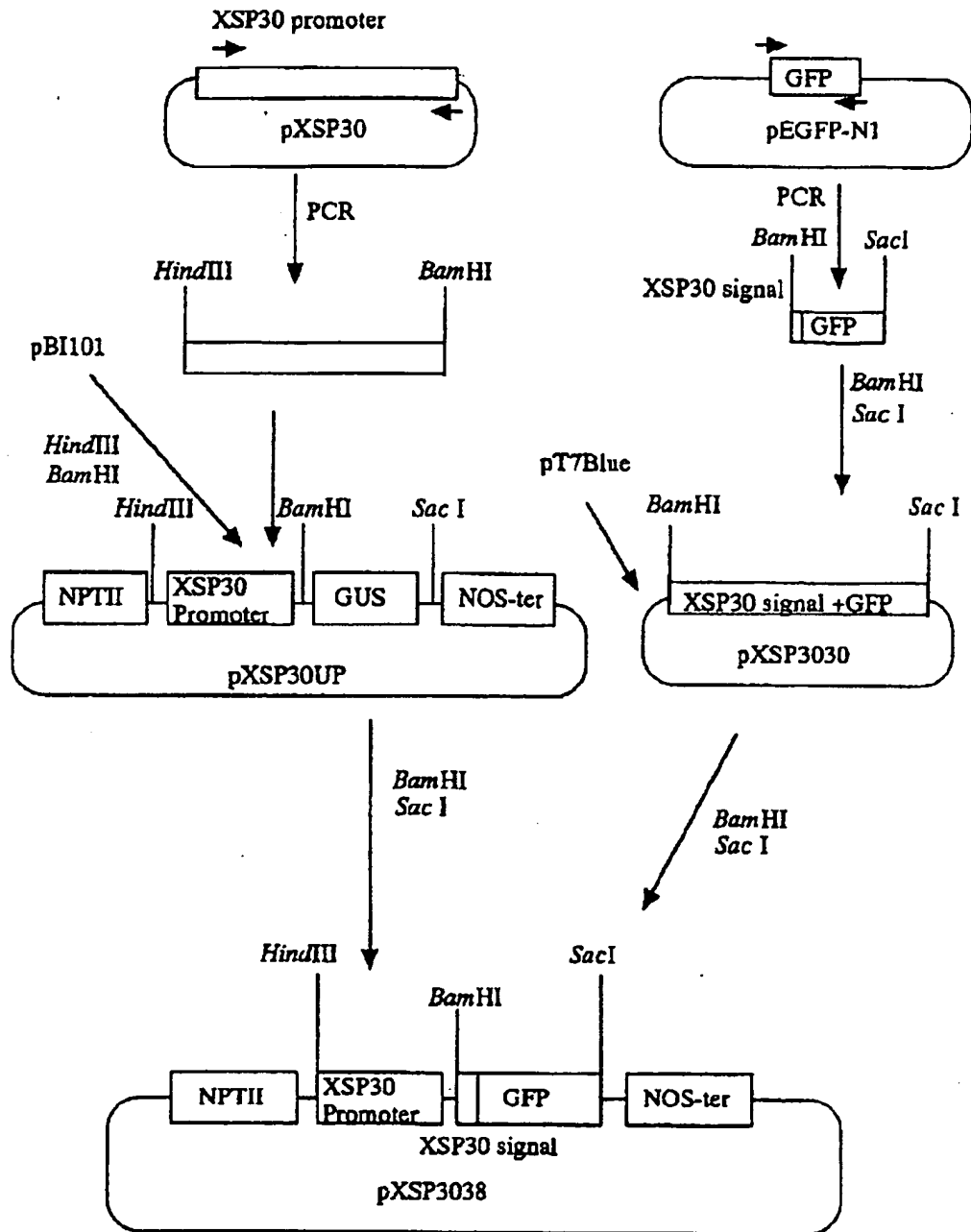
【図5】図5は発現ベクターpXSP403の構築図である。

【図6】図6は発現ベクターpXSP30ALBの構築図である。

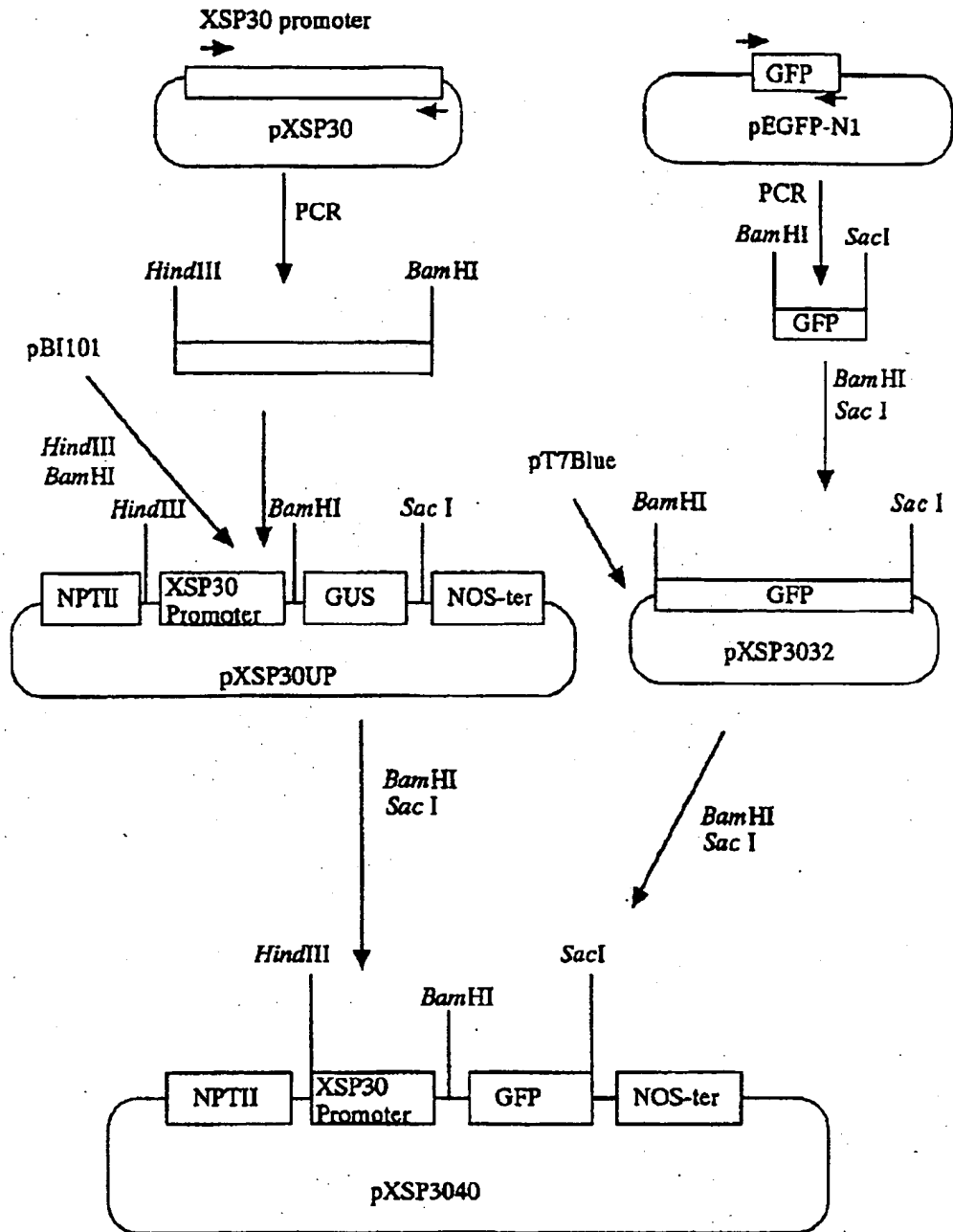
る。

30 【図7】図7は発現ベクターCAMVALBの構築図である。

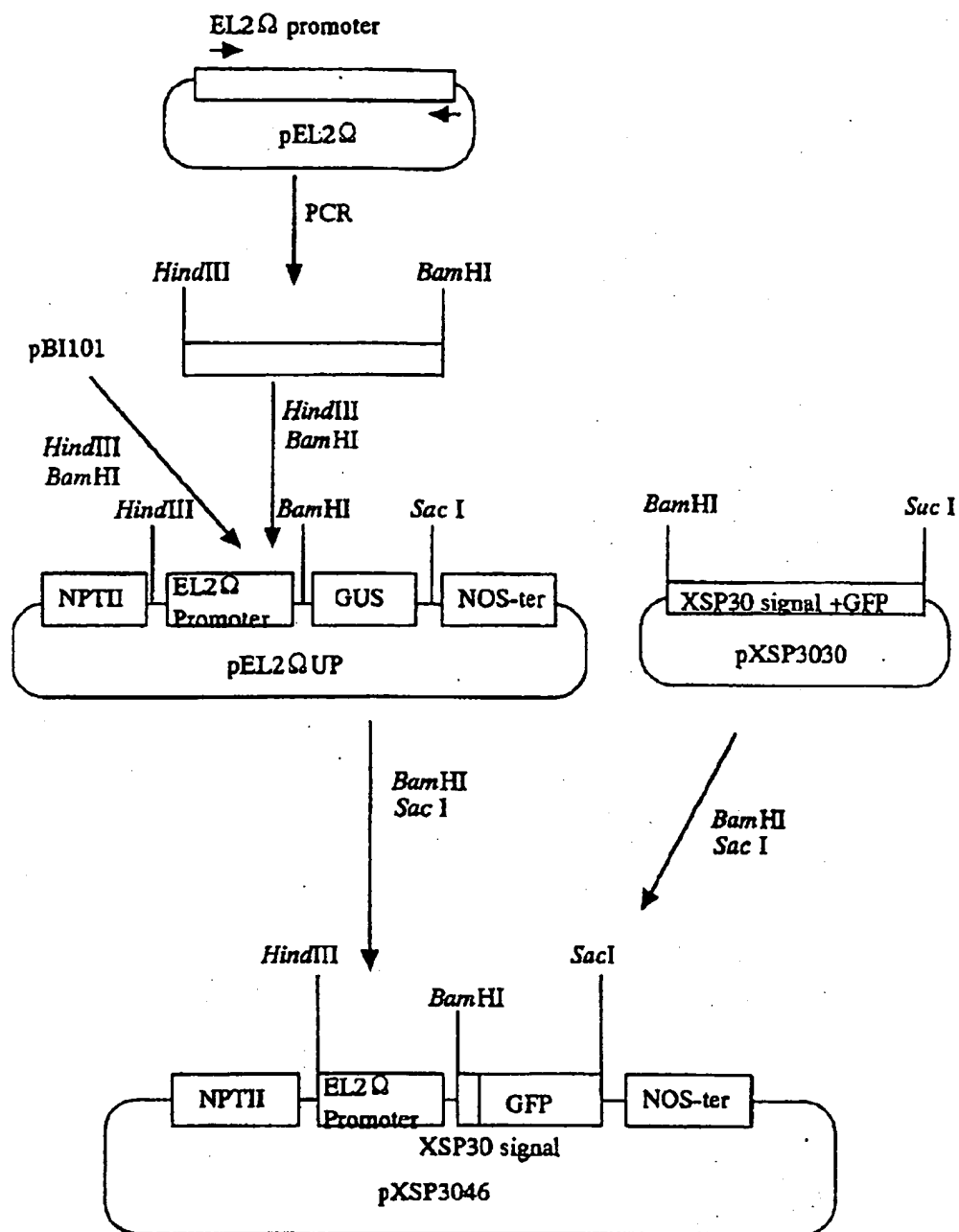
【図1】



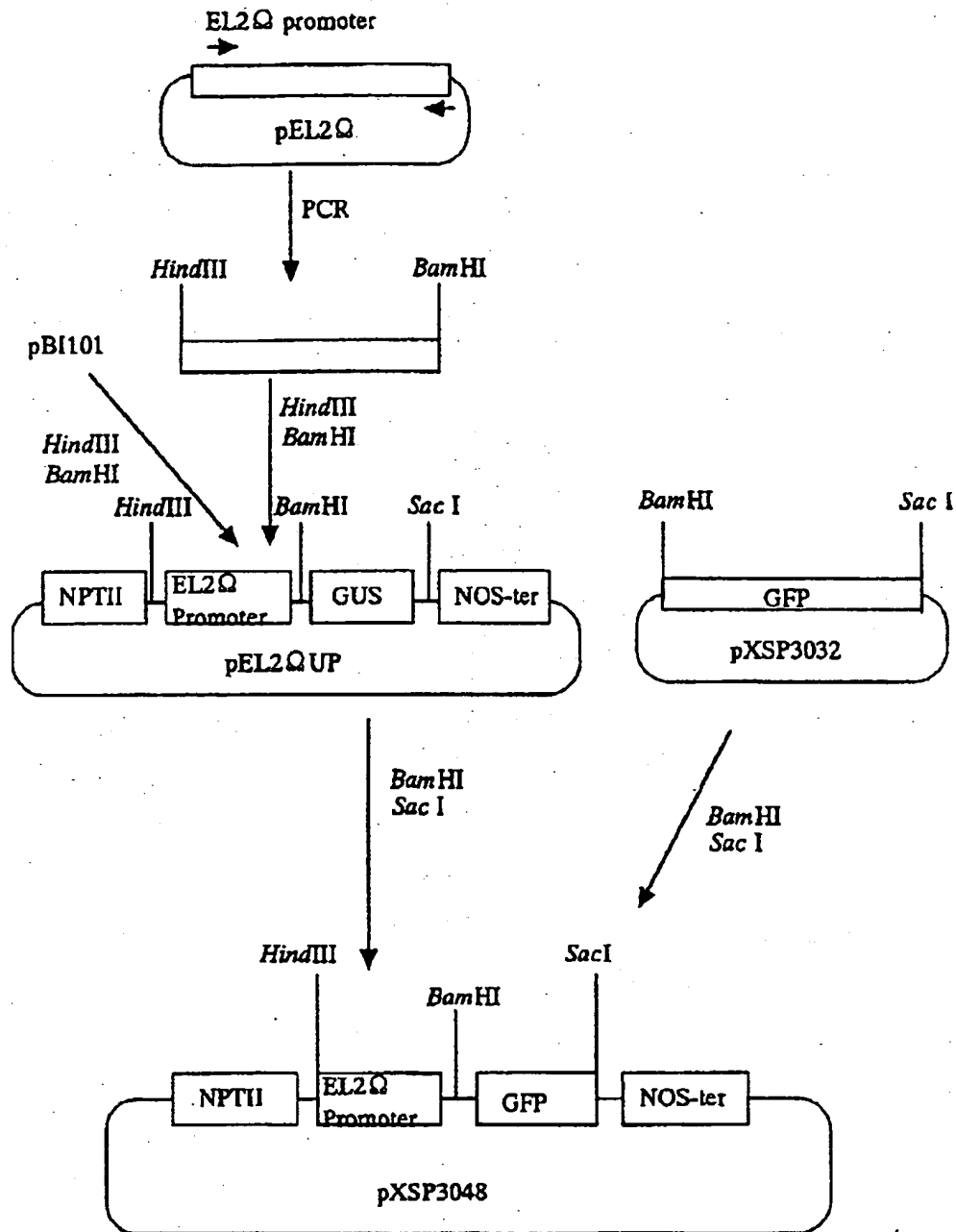
【図2】



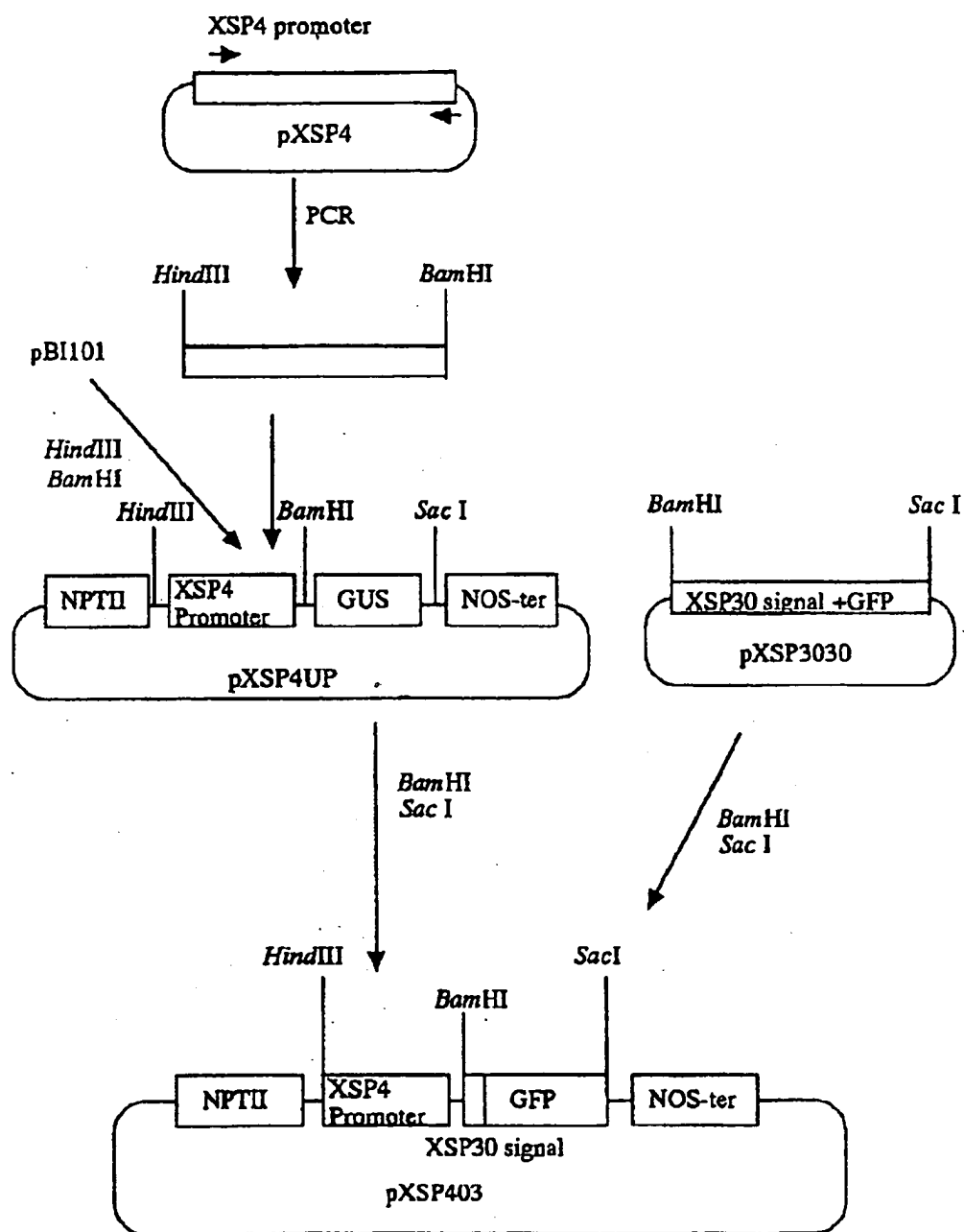
【図3】



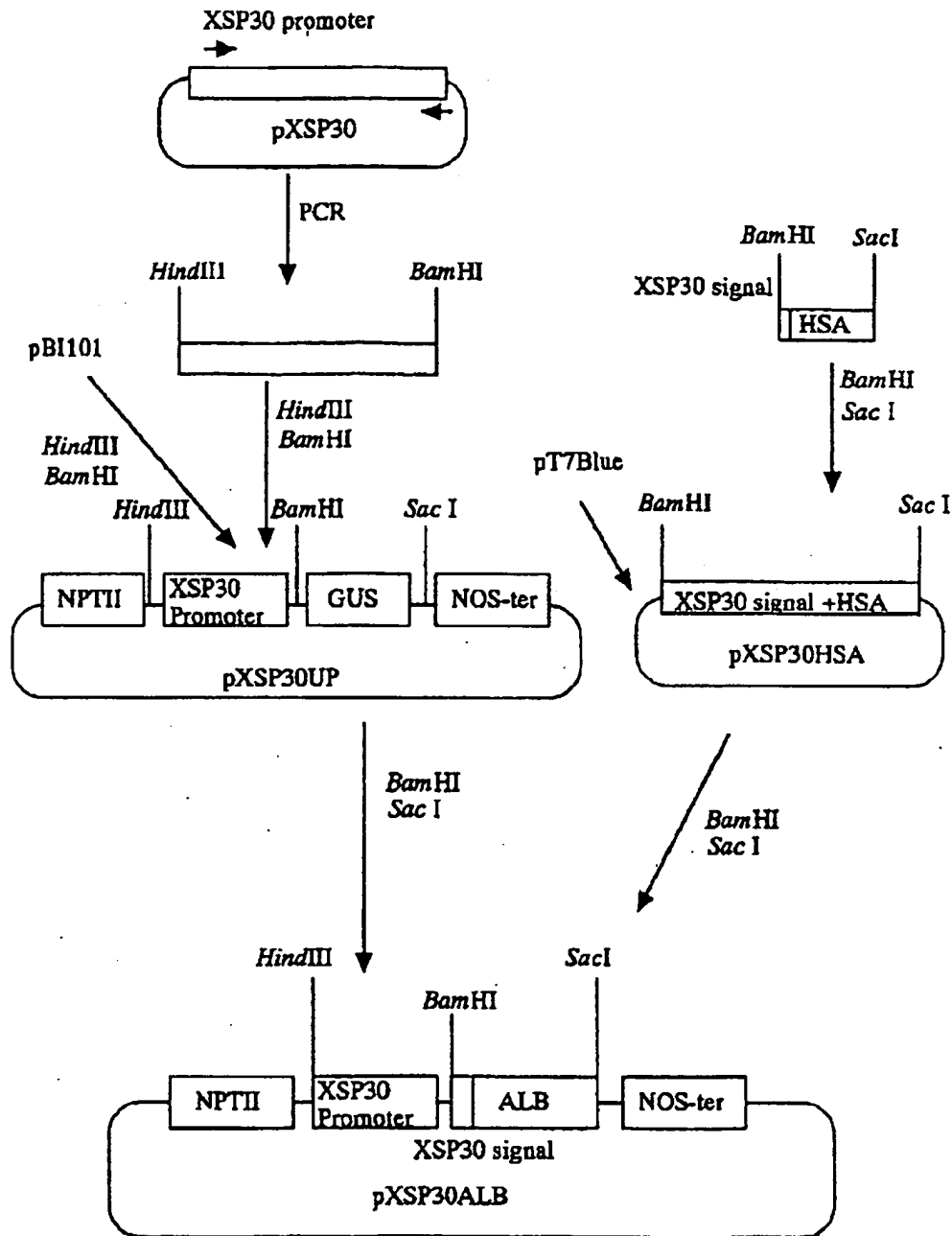
【図4】



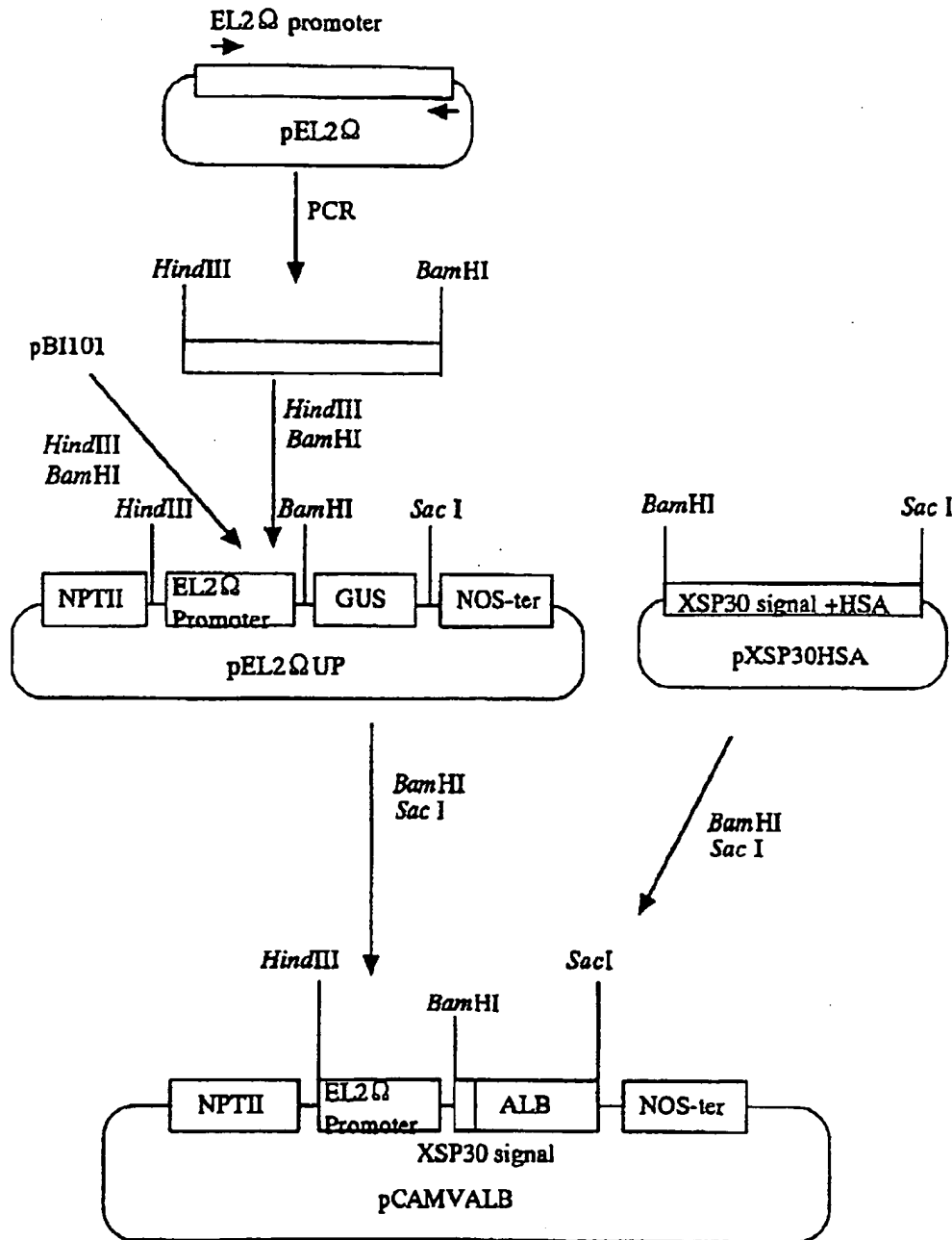
【図5】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト* (参考)

/(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

Fターム(参考) 2B030 AB04 CA06 CA17 CA19 CB02
CD02 CD03 CD07 CD09 CD10
CD14
4B024 AA01 AA08 BA40 CA04 DA01
EA04 FA02 FA18
4B064 AG01 AG24 CA11 CA19 CC24
DA03
4B065 AA88X AA89X AA90Y AA93Y
AB01 AC15 CA24 CA44
4H045 AA10 AA20 BA10 CA40 DA70
EA20 FA72 FA74